

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

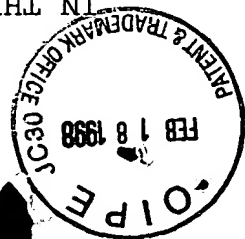
Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



PATENT  
20-4348P

IN THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicants: Ei-jiro WATANABE et al.

Serial No.: 08/992,914 Group:

Filed: December 18, 1997 Examiner:

For: RAFFINOSE SYNTHASE GENES AND THEIR USE

L E T T E R

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, DC 20231  
February 18, 1998

Sir:

Under the provisions of 35 U.S.C. § 119 and 37 C.F.R. § 1.55(a), the applicant(s) hereby claim(s) the right of priority based on the following application(s):

Country Application No. Filed

Japan 8-338673 12/18/96

A certified copy of the above-noted application(s) is(are) attached hereto.  
If necessary, the Commissioner is hereby authorized in this, concurrent, and future replies, to charge payment or credit any overpayment to Deposit Account No. 02-2448 for any additional fee required under 37 C.F.R. §§ 1.16 or 1.17; particularly, extension of time fees.

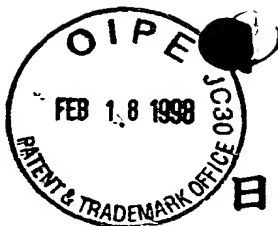
Respectfully submitted,

BIRCH, STEWART, KOLASCH & BIRCH, LLP

By Gerald M. Murphy, Jr.  
Reg. No. 28,977  
P.O. Box 747  
Falls Church, VA 22040-0747  
(703) 205-8000

GMM/JHK/afy  
Attachment  
(Rev. 12/4/97)

#2



日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

Birch Stewart et al  
703-205-8000  
E. Iro WATANABE et al  
0020-4348  
AP# 08/992,914  
12/1

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1996年12月18日

出願番号

Application Number:

平成 8年特許願第338673号

出願人

Applicant(s):

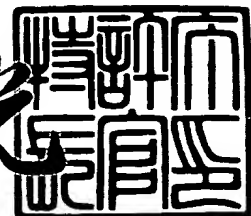
住友化学工業株式会社

1997年12月12日

特許庁長官

Commissioner,  
Patent Office

荒井寿光



出証番号 出証特平09-3102265

【書類名】 特許願

【整理番号】 P147857

【提出日】 平成 8年12月18日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 9/00  
C12N 15/52

【発明の名称】 ラフィノース合成酵素遺伝子及びその利用

【請求項の数】 25

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社  
社内

【氏名】 渡辺 英二郎

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社  
社内

【氏名】 大江田 憲治

【特許出願人】

【識別番号】 000002093

【氏名又は名称】 住友化学工業株式会社

【代表者】 香西 昭夫

【代理人】

【識別番号】 100093285

【弁理士】

【氏名又は名称】 久保山 隆

【電話番号】 06-220-3404

【選任した代理人】

【識別番号】 100094477

【弁理士】

【氏名又は名称】 神野 直美

【電話番号】 06-220-3404

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 010238

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9004612

【包括委任状番号】 9203867

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ラフィノース合成酵素遺伝子及びその利用

【特許請求の範囲】

【請求項1】

植物から得られる約2.7kbpの遺伝子であり、ショ糖分子中のD-グルコース残基の6位炭素原子に結合するヒドロキシル基にD-ガラクトシル基を $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6)結合させることによりラフィノースを生成させる能力を有する酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有することを特徴とするラフィノース合成酵素遺伝子。

【請求項2】

配列番号1に示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列にハイブリダイズする遺伝子であり、ショ糖分子中のD-グルコース残基の6位炭素原子に結合するヒドロキシル基にD-ガラクトシル基を $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6)結合させることによりラフィノースを生成させる能力を有する酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有することを特徴とするラフィノース合成酵素遺伝子。

【請求項3】

植物がマメ科植物であることを特徴とする請求項1又は2記載のラフィノース合成酵素遺伝子。

【請求項4】

マメ科植物がソラマメであることを特徴とする請求項3記載のラフィノース合成酵素遺伝子。

【請求項5】

配列番号1に示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有することを特徴とするラフィノース合成酵素遺伝子。

【請求項6】

配列番号2に示される塩基配列を有することを特徴とするラフィノース合成酵素遺伝子。

【請求項7】

下記(a)又は(b)のアミノ酸配列からなり、かつショ糖分子中のD-グルコース残基の6位炭素原子に結合するヒドロキシル基にD-ガラクトシル基を $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6)結合

させることによりラフィノースを生成させる能力を有することを特徴とするラフィノース合成酵素蛋白質。

(a) 配列番号1に示されるアミノ酸配列。

(b) 配列番号1に示されるアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換、修飾若しくは付加されたアミノ酸配列。

【請求項8】

配列番号1に示されるアミノ酸配列を有することを特徴とするラフィノース合成酵素蛋白質。

【請求項9】

請求項1, 2, 3又は4記載のラフィノース合成酵素遺伝子の部分塩基配列を有することを特徴とする遺伝子断片。

【請求項10】

請求項5又は6記載のラフィノース合成酵素遺伝子の部分塩基配列を有することを特徴とする遺伝子断片。

【請求項11】

塩基数が15以上50以下であることを特徴とする請求項9又は10記載の遺伝子断片。

【請求項12】

請求項9, 10又は11記載の遺伝子断片をプローブとして用いて植物遺伝子断片からハイブリダイゼーション法によりショ糖分子中のD-グルコース残基の6位炭素原子に結合するヒドロキシル基にD-ガラクトシル基を $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6)結合させることによりラフィノースを生成させる能力を有する酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するラフィノース合成酵素遺伝子又はその遺伝子断片を検出することを特徴とするラフィノース合成酵素遺伝子の検出方法。

【請求項13】

請求項9, 10又は11記載の遺伝子断片をプライマーとして用いて植物遺伝子断片に対してPCR(Polymerase Chain Reaction)法を行なうことによりショ糖分子中のD-グルコース残基の6位炭素原子に結合するヒドロキシル基にD-ガラクトシル基を $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6)結合させることによりラフィノースを生成させる能力を有する酵素

のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するラフィノース合成酵素遺伝子又はその遺伝子断片を増幅させることを特徴とするラフィノース合成酵素遺伝子の増幅方法。

【請求項14】

請求項12又は13記載の方法によりラフィノース合成酵素遺伝子又はその遺伝子断片を特定し、特定された前記遺伝子又はその遺伝子断片を単離・精製すること  
を特徴とするラフィノース合成酵素遺伝子の取得方法。

【請求項15】

請求項12又は13記載の方法によりラフィノース合成酵素遺伝子又はその遺伝子断片を特定し、特定された前記遺伝子又はその遺伝子断片を単離・精製すること  
により取得されることを特徴とするラフィノース合成酵素遺伝子。

【請求項16】

プロモーターを請求項1, 2, 3, 4, 5, 6又は15記載のラフィノース合成酵素遺伝子の上流に有することを特徴とするキメラ遺伝子。

【請求項17】

請求項16記載のキメラ遺伝子が宿主生物内に導入されてなることを特徴とする形質転換体。

【請求項18】

請求項1, 2, 3, 4, 5, 6又は15記載のラフィノース合成酵素遺伝子を含むことを特徴とするプラスミド。

【請求項19】

請求項18記載のプラスミドで形質転換されてなることを特徴とする宿主生物又はその細胞。

【請求項20】

請求項18記載のプラスミドで形質転換されてなることを特徴とする微生物。

【請求項21】

請求項18で記載のプラスミドで形質転換されてなることを特徴とする植物又はその細胞。

【請求項22】



請求項1, 2, 3, 4, 5, 6又は15記載のラフィノース合成酵素遺伝子を宿主生物又はその細胞に導入し、宿主生物又はその細胞内のラフィノース類オリゴ糖量を変化させることを特徴とする代謝改変方法。

【請求項23】

請求項20記載の微生物を培養して得られる培養物からラフィノース合成酵素蛋白質を単離・精製することを特徴とするラフィノース合成酵素蛋白質の製造方法。

【請求項24】

請求項7又は8記載のラフィノース合成酵素蛋白質に対して結合能力を有することを特徴とする抗ラフィノース合成酵素抗体。

【請求項25】

請求項24記載の抗ラフィノース合成酵素抗体を供試蛋白質に作用させ、前記抗体とラフィノース合成酵素蛋白質との抗原抗体反応によりラフィノース合成酵素蛋白質を検出することを特徴とするラフィノース合成酵素蛋白質の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ラフィノース合成酵素遺伝子等に関する。

【0002】

【従来技術】

ラフィノース類オリゴ糖は、一般式として $\alpha$ -D-ガラクトピラノシル-(1 $\rightarrow$ 6) $n$ - $\alpha$ -グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-フルクトフラノシドで示されるショ糖の誘導体であり、 $n=1$ の場合にはラフィノース、 $n=2$ の場合にはスタキオース、 $n=3$ の場合にはベルバスコース、 $n=4$ の場合にはアジュコースと呼ばれている。

このようなラフィノース類オリゴ糖は、ショ糖を除けば、植物で最も含量の多いオリゴ糖であり、例えば、トウヒ等のマツ科の裸子植物、ダイズ、インゲンマメ等のマメ科、ナタネ等のアブラナ科、甜菜等のアカザ科、ワタ等のアオイ科、ポプラ等のヤナギ科等の被子植物などの高等植物のみならずクロレラにも含まれていることが明らかにされており、植物界には普遍的に存在している。

ラフィノース類オリゴ糖は、多くの植物では、例えば、貯蔵器官や種子における貯蔵糖としての役割、また、ある種の植物において、例えば、組織間を糖が移動する現象における転流糖としての役割を果たしている。

さらに、植物は低温にさらされると細胞にラフィノース類オリゴ糖を蓄積し、低温ストレスに対抗することが知られている。

一方、ラフィノース類オリゴ糖は、腸内細菌フローラの状態を健全にする作用を有することが知られている。このため、ラフィノース類オリゴ糖は機能性食品素材として一部の食品に添加され、特定保健用食品分野において利用され始められている。

このような役割や有用性を有するラフィノース類オリゴ糖は、多くの植物においてショ糖を初発とするラフィノース類オリゴ糖合成系により生成される。この生合成系は、通常、ショ糖分子中のD-グルコース残基の6位炭素原子に結合するヒドロキシル基に $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6)結合でガラクトシノール由来のガラクトシル基が順次付加されてゆく反応により構成されている。

この生合成系の最初の段階においてショ糖分子中のD-グルコース残基の6位炭素原子に結合するヒドロキシル基にガラクトシノール由来のD-ガラクトシル基を $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6)結合させることによりラフィノースを生成させる反応に関与する酵素がラフィノース合成酵素である。

又、該酵素は前記合成系における律速段階となっていることが示唆されており、該酵素がラフィノース類オリゴ糖の生合成の制御においてきわめて重要であることが明らかにされつつある。

#### 【0003】

##### 【発明が解決しようとする課題】

ところが、ラフィノース合成酵素は、その存在自体はその活性を生化学的な手法により調べることにより多くの植物で確認されているものの、いまだに該酵素を単一の標品として単離・精製することに成功した事例は存在せず、そのアミノ酸配列も不明のままであり、まして該酵素の遺伝子の単離に着手する試みについての報告は全く見られない。

#### 【0004】

【課題を解決するための手段】

このような状況下、本発明者が鋭意検討した結果、ソラマメよりラフィノース合成酵素及びその遺伝子を単離することに成功し、本発明に至った。

すなわち、本発明は、

- 1) 植物から得られる約2.7kbpの遺伝子であり、ショ糖分子中のD-グルコース残基の6位炭素原子に結合するヒドロキシル基にD-ガラクトシル基を $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6)結合させることによりラフィノースを生成させる能力を有する酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有することを特徴とするラフィノース合成酵素遺伝子、
- 2) 配列番号1に示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列にハイブリダイズする遺伝子であり、ショ糖分子中のD-グルコース残基の6位炭素原子に結合するヒドロキシル基にD-ガラクトシル基を $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6)結合させることによりラフィノースを生成させる能力を有する酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有することを特徴とするラフィノース合成酵素遺伝子、
- 3) 植物がマメ科植物であることを特徴とする前項1又は2記載のラフィノース合成酵素遺伝子、
- 4) マメ科植物がソラマメであることを特徴とする前項3記載のラフィノース合成酵素遺伝子、
- 5) 配列番号1に示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有することを特徴とするラフィノース合成酵素遺伝子、
- 6) 配列番号2に示される塩基配列を有することを特徴とするラフィノース合成酵素遺伝子、
- 7) 下記(a)又は(b)のアミノ酸配列からなり、かつショ糖分子中のD-グルコース残基の6位炭素原子に結合するヒドロキシル基にD-ガラクトシル基を $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6)結合させることによりラフィノースを生成させる能力を有することを特徴とするラフィノース合成酵素蛋白質、
  - (a) 配列番号1に示されるアミノ酸配列。
  - (b) 配列番号1に示されるアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換、修飾若しくは付加されたアミノ酸配列。
- 8) 配列番号1に示されるアミノ酸配列を有することを特徴とするラフィノース合

成酵素蛋白質、

- 9) 前項1, 2, 3又は4記載のラフィノース合成酵素遺伝子の部分塩基配列を有することを特徴とする遺伝子断片、
- 10) 前項5又は6記載のラフィノース合成酵素遺伝子の部分塩基配列を有することを特徴とする遺伝子断片、
- 11) 塩基数が15以上50以下であることを特徴とする前項9又は10記載の遺伝子断片、
- 12) 前項9, 10又は11記載の遺伝子断片をプローブとして用いて植物遺伝子断片からハイブリダイゼーション法によりショ糖分子中のD-グルコース残基の6位炭素原子に結合するヒドロキシル基にD-ガラクトシル基を $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6)結合させることによりラフィノースを生成させる能力を有する酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するラフィノース合成酵素遺伝子又はその遺伝子断片を検出することを特徴とするラフィノース合成酵素遺伝子の検出方法、
- 13) 前項9, 10又は11記載の遺伝子断片をプライマーとして用いて植物遺伝子断片に対してPCR(Polymerase Chain Reaction)法を行なうことによりショ糖分子中のD-グルコース残基の6位炭素原子に結合するヒドロキシル基にD-ガラクトシル基を $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6)結合させることによりラフィノースを生成させる能力を有する酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するラフィノース合成酵素遺伝子又はその遺伝子断片を増幅させることを特徴とするラフィノース合成酵素遺伝子の増幅方法、
- 14) 前項12又は13記載の方法によりラフィノース合成酵素遺伝子又はその遺伝子断片を特定し、特定された前記遺伝子又はその遺伝子断片を単離・精製することを特徴とするラフィノース合成酵素遺伝子の取得方法、
- 15) 前項12又は13記載の方法によりラフィノース合成酵素遺伝子又はその遺伝子断片を特定し、特定された前記遺伝子又はその遺伝子断片を単離・精製することにより取得されることを特徴とするラフィノース合成酵素遺伝子、
- 16) プロモーターを前項1, 2, 3, 4, 5, 6又は15記載のラフィノース合成酵素遺伝子上流に有することを特徴とするキメラ遺伝子、
- 17) 前項16記載のキメラ遺伝子が宿主生物内に導入されてなることを特徴とする

形質転換体、

18) 前項1, 2, 3, 4, 5, 6又は15記載のラフィノース合成酵素遺伝子を含むことを特徴とするプラスミド、

19) 前項18記載のプラスミドで形質転換されてなることを特徴とする宿主生物又はその細胞、

20) 前項18記載のプラスミドで形質転換されてなることを特徴とする微生物、

21) 前項18で記載のプラスミドで形質転換されてなることを特徴とする植物又はその細胞、

22) 前項1, 2, 3, 4, 5, 6又は15記載のラフィノース合成酵素遺伝子を宿主生物又はその細胞に導入し、宿主生物又はその細胞内のラフィノース類オリゴ糖量を変化させることを特徴とする代謝改変方法、

23) 前項20記載の微生物を培養して得られる培養物からラフィノース合成酵素蛋白質を単離・精製することを特徴とするラフィノース合成酵素蛋白質の製造方法、

24) 前項7又は8記載のラフィノース合成酵素蛋白質に対して結合能力を有することを特徴とする抗ラフィノース合成酵素抗体、

25) 前項24記載の抗ラフィノース合成酵素抗体を供試蛋白質に作用させ、前記抗体とラフィノース合成酵素蛋白質との抗原抗体反応によりラフィノース合成酵素蛋白質を検出することを特徴とするラフィノース合成酵素蛋白質の検出方法、  
を提供するものである。

【0005】

【発明の実施の形態】

以下、詳細に本発明について説明する。なお、以下に記述された遺伝子工学的方法は、例えば、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0-87969-309-6、「Current Protocols In Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN 0-471-50338-X、Current Protocols In Protein Science (1995), John Wiley & Sons, Inc. ISBN 0-471-11184-8等に記載される通常の方法に準じて実施可能である。

## 【0006】

本発明でいうラフィノース合成酵素遺伝子（以下、本発明遺伝子と記す。）とは、例えば、「植物から得られる約2.7kbpの遺伝子であり、ショ糖分子中のD-グルコース残基の6位炭素原子に結合するヒドロキシル基にD-ガラクトシル基を $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6)結合させることによりラフィノースを生成させる能力を有する酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子」や「配列番号1に示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列にハイブリダイズする遺伝子であり、ショ糖分子中のD-グルコース残基の6位炭素原子に結合するヒドロキシル基にD-ガラクトシル基を $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6)結合させることによりラフィノースを生成させる能力を有する酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子」をいう。

ここで「ハイブリダイズする」とは、例えば、95℃、1分という条件の熱処理や、0.5M NaOH、1.5M NaClという条件のアルカリ処理により、二本鎖からなるDNAを相補的な一本鎖DNAに解離させた後、例えば、氷上に1分放置するという条件の放熱や0.5M Tris·HCl (pH7.0)、3.0M NaClという条件の中和処理により前記一本鎖DNAに対して相補性を有する一本鎖DNAや一本鎖RNAを会合させ、再び二本鎖状態になることを意味し、そして「ハイブリダイズする遺伝子」とは上記のような相補性を有する遺伝子を意味する。具体的には、例えば、配列番号1に示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列のうち、400アミノ酸残基以上の長さに相当する領域において、約50%以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するような遺伝子をあげることができる。

本発明遺伝子は、例えば、ソラマメ (*Vicia faba*) 等のマメ科植物由来のラフィノース合成酵素遺伝子があり、具体的には、例えば、「配列番号1に示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するラフィノース合成酵素遺伝子」や、「配列番号2に示される塩基配列を有するラフィノース合成酵素遺伝子」等があげられる。

## 【0007】

本発明遺伝子は、例えば、下記の方法により得ることができる。

例えば、ソラマメ (*Vicia faba*) 等のマメ科植物の種子、葉などの組織を採取し、採取した組織を液体窒素中で凍結させた後、乳鉢などにより物理的に磨砕す

ることにより細かい粉末状の組織片とする。該組織片から通常の方法によりRNAを抽出する。該抽出操作には、市販のRNA抽出キットを利用すると良い。そして、得られたRNA抽出液からエタノール沈澱により全RNAを回収する。次に、回収した全RNAから通常の方法によりポリAを有するRNAを分画する。該分画操作には、市販のOligo dTカラムを利用すると良い。得られた画分(ポリAを有するRNA)から通常の方法によりcDNAを合成する。該合成操作には、市販のcDNA合成キットを利用すると良い。得られたcDNAを鋳型として、例えば、下記リスト1に示されるプライマーによるPCRを行ない、本発明遺伝子のcDNA断片を取得することができる。この際に用いられるプライマーは、目的に応じて配列番号2で示される塩基配列を基にして設計することができ、例えば、下記リスト2で示される塩基配列のように設計することでオープンリーディングフレーム領域を増幅することができる。増幅されたDNA断片は、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 「Current Protocols In Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN0-471-50338-X等に記載される通常の方法に準じてサブクロニングすることができる。具体的には、例えばInvitrogen社のTAクローニングキットやStratagene社のpBluescript Iなどのプラスミドベクターを用いることでクローニングすることができる。クローニングされたDNA断片の塩基配列の確認は、F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson 著、Proceedings of National Academy of Science U.S.A. (1977), 74, 5463頁-5467頁等に記載されるダイデオキシターミネーティング法により行なうことができる。例えば、市販のパーキンエルマー社のABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kitなどを用いると良い。

## 【0008】

## (リスト1)

プライマー1 AATTTTCAAG CATAGCCAAG TTAACACCT 30mer

プライマー2 GCTCACAAGA TAATGATGTT AGTC 24mer

プライマー3 ATACAAGTGA GGAAGTTGAC CA 22mer

## 【0009】

## (リスト2)

プライマー4 ATGGCACCAC CAAGCATAAC CAAAACCTGC 29mer

プライマー5 ATGGCACCAC CAAGCATAAC CAAAACCTGCA ACCCTCCAAG ACG 43mer

プライマー6 TCAAAATAAA AACTGGACCA AAGAC 25mer

プライマー7 TCAAAATAAA AACTGGACCA AAGACAATGT 30mer

【0010】

本発明でいう遺伝子断片（以下、本発明遺伝子断片と記す。）とは、本発明遺伝子の部分塩基配列を有する遺伝子断片をいい、例えば、「植物から得られる約2.7kbpの遺伝子であり、ショ糖分子中のD-グルコース残基の6位炭素原子に結合するヒドロキシル基にD-ガラクトシル基を $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6)結合させることによりラフィノースを生成させる能力を有する酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子の部分配列を有する遺伝子断片」や「配列番号1に示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列にハイブリダイズする遺伝子であり、ショ糖分子中のD-グルコース残基の6位炭素原子に結合するヒドロキシル基にD-ガラクトシル基を $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6)結合させることによりラフィノースを生成させる能力を有する酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子の部分塩基配列を有する遺伝子断片」等があげられ、具体的には、例えば、「配列番号1に示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子の部分塩基配列を有する遺伝子断片」や「配列番号2に示される塩基配列を有する遺伝子の部分塩基配列を有する遺伝子断片」等をあげることができる。

これら遺伝子断片は、ハイブリダイゼーション法におけるプローブやPCR (Polymerase Chain Reaction) 法におけるプライマーとして有用である。特にPCR法におけるプライマーとしては、塩基数が15以上50以下である遺伝子断片が好ましい。

【0011】

本発明遺伝子断片をハイブリダイゼーション法におけるプローブとして利用して、植物遺伝子ライブラリーから、ショ糖分子中のD-グルコース残基の6位炭素原子に結合するヒドロキシル基にD-ガラクトシル基を $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6)結合させることによりラフィノースを生成させる能力を有する酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するラフィノース合成酵素遺伝子又はその遺伝子断片を検出すること



が可能である（以下、本発明検出方法と記す。）。

【0012】

具体的には、例えば「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Pressや「Current Protocols In Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN0-471-50338-X等に記載される方法に準じて行うことができる。尚、ここで用いられる植物遺伝子ライブラリーとしては、例えば、目的の植物のcDNAライブラリー等genomicDNAライブラリー等をあげることができる。植物遺伝子ライブラリーは、市販の植物由来のライブラリーをそのまま用いることもできるし、また「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Pressや「Current Protocols In Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN0-471-50338-X等に記載される通常のライブラリー作製法に従って作製されたライブラリーも用いることができる。

ハイブリダイゼーション法としては、使用されるライブラリーに応じてプレークハイブリダイゼーションやコロニーハイブリダイゼーションをあげることができる。

具体的には、使用されるライブラリーがファージベクターで構築された場合には、まず適当な宿主微生物とファージを感染可能な条件下で混合した後さらに軟寒天培地と混合し、寒天培地上にまく。その後適当な大きさのプレークが現れるまで37℃で培養を行う。

また、使用されるライブラリーがプラスミドベクターで構築された場合には、まず適当な宿主微生物に形質転換し、形質転換体を得る。得られた形質転換体を適当に希釈して寒天培地にまき、適当な大きさのコロニーが現れるまで37℃で培養を行う。

いずれのライブラリーの場合も培養後メンブレンフィルターを寒天培地の表面にのせ、ファージや形質転換体をメンブレンに転写する。このメンブレンをアルカリによる変性処理後、中和し、例えば、ナイロンメンブレンの場合には紫外線を照射し、DNAをメンブレンに固定する。次にこのメンブレンと通常の方法によりラベル化された本発明遺伝子断片をプローブとして用いてハイブリダイゼーシ

ョン法を行う。この方法については、例えば、D M Glover編「DNA cloning, a practical approach.」 IRL PRESS (1985) ISBN 0-947946-18-7を参考にするとうよい。ハイブリダイゼーションを行う際の試薬及び温度条件は多種存在するが、例えば、プレハイブリダイゼーションは6×SSC(0.9M NaCl, 0.09Mクエン酸)、0.1～1%SDS、100 μg/ml変性サケ精巢DNAを加えて65℃で1時間インキュベートして行い、ラベル化された本発明遺伝子断片をプローブとして次に加え、混合する。42～68℃で4～16時間ハイブリダイゼーションを行い、次に2×SSC、0.1～1%SDSで洗浄し、さらに0.2×SSC、0～0.1%SDSですすいだ後メンブレンを乾かす。このメンブレンを、例えば、オートラジオグラフィーなどにより解析することでメンブレン上のプローブの位置を確認することができ、用いたプローブと相同性のある塩基配列を持つクローンを選び出すことができる。同様の操作を繰り返すことでクローンを純化することができる。

このようにしてショ糖分子中のD-グルコース残基の6位炭素原子に結合するヒドロキシル基にD-ガラクトシル基を $\alpha$  (1→6)結合させることによりラフィノースを生成させる能力を有する酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するラフィノース合成酵素遺伝子又はその遺伝子断片を検出することができる。

#### 【0013】

また、市販のGibcoBRL社のGENE TRAPPER cDNA Positive Selection Systemキットの様な方法も用いることができる。この方法では、まず一本鎖化したDNAライブラリーとビオチン化した本発明遺伝子断片（プローブ）とをハイブリダイズさせた後、ストレプトアビジン結合マグネットビーズを次に加え混合し、さらにストレプトアビジン結合マグネットビーズを磁石で回収することで、用いたプローブと相同性のある塩基配列を有する一本鎖DNAを回収することができる。得られた一本鎖DNAは適当なオリゴヌクレオチドをプライマーとして適当なDNAポリメラーゼを用いて二本鎖化することができる。

このようにしてショ糖分子中のD-グルコース残基の6位炭素原子に結合するヒドロキシル基にD-ガラクトシル基を $\alpha$  (1→6)結合させることによりラフィノースを生成させる能力を有する酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するラフィノース合成酵素遺伝子又はその遺伝子断片を検出することができる。

## 【0014】

尚、本発明検出方法を植物の解析に利用してもよい。具体的には、特定植物種の異なる品種から植物ゲノムDNAを、例えば、渡辺格監修、杉浦昌弘編集：「クローニングとシーケンス(植物バイオテクノロジー実験マニュアル)」、農村文化社、東京(1989)などに記載された通常の方法に従って調製し、適当な少なくとも数種類の制限酵素で切断し、電気泳動した後、通常の方法に従ってブロッティングしたフィルターを作製する。このフィルターに既に述べた通常の方法で調製されたプローブを用いてハイブリダイゼーションを行ない、プローブがハイブリダイズするDNA断片の長さの違いから品種間のラフィノース類オリゴ糖発現に伴う表現形質の差を解析する。また、この方法により特定の植物と同種の非遺伝子組換え植物とで比較したときに非遺伝子組換え植物よりもハイブリダイズするバンドの数が多く検出された場合、該植物が遺伝子組換え植物であると判別することができる。この方法は、例えば、島本功、佐々木卓治監修：「植物のPCR実験プロトコール」、秀潤社、東京(1995)、ISBN4-87962-144-7、90-94頁に記載されるRFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)法に準じて行なうと良い。

## 【0015】

又、本発明遺伝子断片をPCR法におけるプライマーとして利用して、植物遺伝子ライブラリーから、ショ糖分子中のD-グルコース残基の6位炭素原子に結合するヒドロキシル基にD-ガラクトシル基を $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6)結合させることによりラフィノースを生成させる能力を有する酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するラフィノース合成酵素遺伝子又はその遺伝子断片を増幅することが可能である(以下、本発明増幅方法と記す。 )。

## 【0016】

具体的には、植物遺伝子ライブラリーを鋳型にして、少なくとも3'-末端に、本発明遺伝子の部分塩基配列を有するような本発明遺伝子断片、好ましくは塩基数が15以上50以下である本発明遺伝子断片をプライマーとして通常の合成方法により合成し、合成されたプライマーの中からラフィノース合成酵素のN末端側のセンスプライマーとC末端側のアンチセンスプライマーの適当な組み合わせを用いるPCR法をあげることができる。増幅したDNAは通常の電気泳動の方法により確

認することができる。このとき、転写により合成される mRNA の塩基配列と同じ塩基配列を持つプライマーをセンスプライマー、mRNA の塩基配列と相補鎖をなす塩基配列を持つプライマーをアンチセンスプライマーと呼ぶ。例えば、コドン表(図1)に基づき、一つのそれぞれのアミノ酸に対するコドンの塩基配列に応じてプライマーの特定の位置の残基を数種類の塩基の混合物とするミックスプライマーとして合成することもできる。また、例えば、イノシンなどの複数種の塩基と対合できる塩基を数種類の塩基の混合物の代わりに用いることもできる。ここで用いられる植物遺伝子ライブラリーとしては、例えば、目的の植物の cDNA ライブラリーや genomic DNA ライブラリー等をあげることができる。植物遺伝子ライブラリーは、市販の植物由来のライブラリーをそのまま用いることもできるし、また「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press や「Current Protocols In Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN0-471-50338-X 等に記載される通常のライブラリー作製法に従って作製されたライブラリーも用いることができる。又、本発明増幅法においては植物遺伝子ライブラリーとして目的の植物より調製された cDNA や genomic DNA を直接用いることもできる。

#### 【0017】

尚、本発明増幅方法を植物遺伝子の解析に利用してもよい。具体的には、例えば、特定植物種の異なる品種から調製した植物ゲノム DNA を鋳型として、本発明遺伝子断片をプライマーとして用いる PCR 法を行ない、本発明遺伝子領域を増幅させる。得られた PCR 産物をホルムアルデヒド溶液と混合し、85℃で5分加熱変性処理を行った後、氷上で急冷する。このサンプルをグリセロール濃度が0%または10%含む、例えば6%のポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行なう。この電気泳動には市販のSSCP(Single Strand Conformation Polymorphism)用の電気泳動装置を用い、例えば5℃、25℃、37℃等にゲルの温度を一定に保って電気泳動を行なう。電気泳動したゲルは、例えば、市販の試薬による銀染色法等の方法により DNA 断片を検出する。

検出された DNA 断片の電気泳動度の差から本発明遺伝子内の変異に基づく品種間のラフィノース類オリゴ糖発現に伴う表現形質の差を解析する。この方法は、

例えば、島本功、佐々木卓治監修：「植物のPCR実験プロトコール」、秀潤社、東京(1995)、ISBN4-87962-144-7、141-146頁に記載されるSSCP法に準じて行うと良い。

#### 【0018】

このような本発明検出方法又は本発明増幅方法によりラフィノース合成酵素遺伝子又はその遺伝子断片を特定し、特定された前記遺伝子又はその遺伝子断片を単離・精製することによりラフィノース合成酵素遺伝子を取得することもできる。

#### 【0019】

このようにして取得されたラフィノース合成酵素遺伝子又は前述の本発明遺伝子の上流にプロモーターを有するようにキメラ遺伝子（以下、キメラ遺伝子と記す。）を構築する。用いられるプロモーターは、形質転換される宿主生物内で機能可能なものであれば特に制限はないが、例えば、宿主生物が植物又はその細胞の場合には、例えば、ノバリン合成酵素遺伝子(NOS)プロモーター、オクトピン合成酵素遺伝子(OCS)プロモーターなどのT-DNA由来の構成型プロモーターカリフラワーモザイクウイルス(CaMV)由来の19S及び35Sプロモーターなどの植物ウイルス由来のプロモーター、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)遺伝子プロモーター、カルコンシンターゼ(CHS)遺伝子のプロモーター、Pathogenesis-related protein(PR)遺伝子のプロモーターなどの誘導プロモーターなどをあげることができる。また、特定の植物組織で特異的に発現するようなプロモーター、例えば、ダイズ由来種子貯蔵蛋白質グリシニン遺伝子のプロモーターを持つベクターpSUM-GY1（特開平06-189777）などもあげられ、このようなプロモーターを有するように構築されたキメラ遺伝子を用いれば、植物内での特定の組織においてラフィノース類オリゴ糖の含量を増加又は減少させることが可能になる。

#### 【0020】

次に、本発明キメラ遺伝子を通常の遺伝子工学的方法に準じて宿主生物内に導入することにより形質転換体を得る。尚、宿主生物内に導入するための形質転換方法に応じて本発明キメラ遺伝子をプラスミドの形にしてから使用するとよい。さらに、必要に応じて本発明キメラ遺伝子にターミネーターを含有させてもよい。

。この場合、ラフィノース合成酵素遺伝子の下流にターミネーターを有するようにキメラ遺伝子を構築するとよい。用いられるターミネーターは、形質転換される宿主生物内で機能可能なものであれば特に制限はないが、例えば宿主生物が植物又はその細胞の場合には、例えば、ノパリン合成酵素遺伝子(NOS)ターミネーターなどのT-DNA由来の構成型ターミネーター、ニンクウイルスGV1、GV2のターミネーターなどの植物由来のターミネーターなどをあげることができる。

## 【0021】

取得されたラフィノース合成酵素遺伝子又は前述の本発明遺伝子を利用するには、通常の遺伝子工学的方法によりプラスミドの形にして使用するとよい。

構築されたプラスミドは、例えば、宿主生物が微生物の場合には、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Pressや「Current Protocols In Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN0-471-50338-X等に記載される公知の手段により微生物に導入され、これにより形質転換された微生物を抗生物質耐性や栄養要求性等のマーカーにより選択することにより形質転換体を得られ、又、例えば、宿主生物が植物の場合には、アグロバクテリウム感染方法(特公平2-58917および特開昭60-70080)、プロトプラストへのエレクトロポレーション方法(特開昭60-251887および特開平5-68575)、またはパーティクルガン方法(特開平5-508316および特開昭63-258525)などの公知の手段により植物細胞に導入され、このようにして形質転換された植物細胞をカナマイシン又はハイグロマイシン等の抗生物質により選抜し、例えば内宮著、「植物遺伝子操作マニュアル(トランスジェニック植物の作り方)」1990年、講談社サイエンティフィック(ISBN4-06-153513-7)、27-55頁に記載される通常の植物細胞培養方法により形質転換植物を再生し形質転換体植物を得る。さらに、得られた形質転換体植物から種子を得ることにより増殖を行うこともできる。また、得られた形質転換体植物と交雑することで形質転換体の形質をもつ子孫植物を作成することもできる。

## 【0022】

取得されたラフィノース合成酵素遺伝子又は前述の本発明遺伝子を宿主生物又はその細胞に導入し、宿主生物又はその細胞内のラフィノース類オリゴ糖量を変

化させる代謝改変方法としては、例えば、当該ラフィノース合成酵素遺伝子を本来遺伝子が転写・翻訳され蛋白質として発現するときの方向である順方向（正方向）に連結してなる本発明キメラ遺伝子を構築し、これを通常の遺伝子工学的の方法に準じて宿主生物又はその細胞内に導入することで宿主生物又はその細胞内のラフィノース類オリゴ糖量を増加させるように代謝を改変させる方法や、逆に、当該ラフィノース合成酵素遺伝子を本来遺伝子が転写・翻訳され、蛋白質として発現するときの方向とは反転した方向である逆方向（負方向）に連結してなる本発明キメラ遺伝子を構築し、これを通常の遺伝子工学的の方法に準じて宿主生物又はその細胞内に導入することで宿主生物又はその細胞内のラフィノース類オリゴ糖量を減少させるように代謝を改変させる方法等があげられる。

## 【0023】

本発明でいうラフィノース合成酵素蛋白質（以下、本発明蛋白質と記す。）とは、例えば、配列番号1に示されるアミノ酸配列、又は、配列番号1に示されるアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換、修飾若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつショ糖分子中のD-グルコース残基の6位炭素原子に結合するヒドロキシル基にD-ガラクトシル基を $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6)結合させることによりラフィノースを生成させる能力を有する酵素蛋白質をいう。

具体的には、例えば、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有する酵素蛋白質（アミノ酸799個、分子量89kDa）をあげることができる。

## 【0024】

本発明蛋白質は、例えば、ソラマメ（*Vicia faba*）等のマメ科植物から、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沈殿、イオン交換カラム、疎水性カラム、ハイドロキシアパタイトカラム、ゲルろ過カラムなどの通常の生化学的方法により調製することもできるが、本発明プラスミドで形質転換されてなる宿主生物又はその細胞により調製することもできる。具体的には、例えば、ファルマシア社のGST Gene Fusion Vectorsキットを用いて本発明遺伝子を該発現ベクタープラスミドに導入し、得られたベクタープラスミドを通常の遺伝子工学的の方法に準じて、大腸菌等の微生物に形質転換し、得られた形質転換体を、例えば、IPTG(isopropylthio- $\beta$ -D-galactoside)を添加した培地にて培養することにより培養物中に本発明蛋白質を融合

蛋白質として発現誘導させることができる。発現誘導させた融合蛋白質は、通常の菌体破壊処理、カラム操作、SDS-PAGE電気泳動等の方法によって単離・精製することができる。そして、得られた融合蛋白質をトロンビンまたは血液凝固因子Xa等のプロテアーゼで切断処理することにより本発明蛋白質が得られる。好ましくは、例えば「Current Protocols In Protein Science」(1995), John Wiley & Sons, Inc. ISBN0-471-11184-8に記載される方法に準じて行なうと良い。尚、本発明蛋白質の活性は、例えば、L. Lehle and W. Tanner, Eur. J. Biochem., 38, 103頁-110頁 (1973) に記載される方法により測定できる。

## 【0025】

このようにして、調製された本発明蛋白質を抗原として用いた通常の免疫学的方法によりラフィノース合成酵素蛋白質に対して結合能力を有する抗ラフィノース合成酵素抗体（以下、本発明抗体と記す。）を作製することができる。具体的には、例えば、Ed Harlow and David Lane, 「Antibodies:A Laboratory Manual」 (1988), Cold Spring Harbor Laboratory Press ISBN No.0-87969-314-2に記載される方法をあげることができる。このようにして作成された本発明抗体を試蛋白質に作用させ、前記抗体とラフィノース合成酵素蛋白質との抗原抗体反応によりラフィノース合成酵素蛋白質を検出することができる。具体的には、例えば、ウエスタンブロット法、ELISA法等のEd Harlow and David Lane, 「Antibodies:A Laboratory Manual」 (1988), Cold Spring Harbor Laboratory Press記載の免疫学的手法をあげることができる。

## 【0026】

尚、ウエスタンブロット法は、例えば、以下のようにして行う。まず、対象となる植物から、例えば、Methods in Enzymology, volume182, 「Guide to Protein Purification」 174頁～193頁 ISBN 0-12-182083-1に記載される方法に準じて蛋白質を抽出する。尚、用いられる植物組織に応じて適宜抽出液の組成を変えることができる。抽出された蛋白質は、通常のSDS-PAGEの方法に従って電気泳動する。電気泳動されたゲルの中の蛋白質は、通常の電氣的な方法によるウエスタンブロットによりメンブレンに転写させる。例えば、ゲルをトランスファーバッファ(25mM Tris, 192mM グリシン, 20%メタノール)に10分間浸し、その後市販の



セミドライ型のトランスファー装置にゲルの大きさに切ったPVDF膜と合わせてセットする。1cm<sup>2</sup>当り0.8~2mAの定電流条件で45分間から1時間ブロッティングを行う。メンブレンに転写された蛋白質はアルカリ性フォスファターゼやホースラディッシュスーパーオキシダーゼを結合させた二次抗体又はProteinAなどを用いたウェスタンブロット検出用のキットを用いて免疫学的検出を行うことができる。この際、本発明抗体を使用することでメンブレン上のラフィノース合成酵素蛋白質を検出することができる。

#### 【0027】

また、ELISA法は、例えば、原理的には、樹脂製の96ウェルのELISAプレートの表面に蛋白質が結合する性質を利用して、最終的にELISAプレートの表面に結合している抗原を免疫学的に検出する。まず、ELISAプレートに供試蛋白質を溶液として加え、該蛋白質を結合させた後、例えば、5%牛血清アルブミンなどの蛋白質を含んだPBSを加え、ブロッキングする。その後PBSで洗浄した後、本発明抗体を含む溶液を加え、反応させる。次に洗浄を行った後、さらにアルカリ性フォスファターゼやホースラディッシュスーパーオキシダーゼを結合させた二次抗体を含む溶液を加え、洗浄する。最後に検出するための基質溶液を加えてELISAリーダーで検出する。

また本発明抗体をELISAプレートに加えて結合させた後、例えば、5%牛血清アルブミンなどの蛋白質を含んだPBSを加え、ブロッキングする。次に供試蛋白質を溶液として加え、該抗原を結合させた後、洗浄し、さらに本発明抗体を加える。この際に使用する本発明抗体は最初に用いた本発明抗体とは異なる動物種から調製されたものであることが望ましい。次にアルカリ性フォスファターゼやホースラディッシュスーパーオキシダーゼを結合させた二次抗体を含む溶液を加え、洗浄する。この際に使用する二次抗体は後から加えた本発明抗体と結合する性質のものでなければならない。最後に検出するための基質溶液を加えてELISAリーダーで検出する。

#### 【0028】

#### 【実施例】

以下に実施例をあげて本発明をより詳細に説明するが、本発明は以下の実施例

にのみ限定されるものではない。

【0029】

実施例1 (ガラクチノールの精製)

甜菜廃糖蜜約250mlをメタノールで5倍に希釈した。該希釈液を室温で2l, 400g、15分遠心し、不溶物を除去した。得られた上澄みを2lの三角フラスコに移し、これに1/2量のイソプロパノールを攪拌しながら少量ずつ添加した。沈澱が器壁に付着するまでしばらく室温で放置した。次にデカンテーションで上澄みを廃棄した。沈澱に500mlのエタノールを加え、これをロータリーシェーカーで攪拌して洗浄した。この洗浄をさらに数回繰り返した。洗浄された沈澱を器壁よりかきとり、これを濾紙上で風乾した。風乾された沈澱(乾燥粉末)は約40%(w/v)になるように精製水で溶解された。この溶液にBioRad社のAG501-X8(D)を加え、攪拌した。溶液の色がほぼ観察されなくなるまで、この操作を繰り返した。得られた溶液をMillipore社のSep-Pak QMAカラムで処理をした。さらにMillipore社のSep-Pak CMカラム、Millipore社のSep-Pak C18カラム、Millipore社のSep-Pak Silicaカラムで前処理した。得られた溶液5mlをWako-gel LP40C18(和光純薬:2.6cm×85cm)カラムにかけ、精製水で溶出した。溶出液の糖度は携帯用砂糖屈折計で測定され、糖の組成はMillipore社のSugar-Pak Na(7.8mm×300mm)カラムを用いたHPLCにより分析された。検出はWaters社の410 Defferential Refractometerで行なった。ガラクチノールを含む溶出液は凍結乾燥され、得られた凍結乾燥粉末を精製水5mlに溶解し、TOYOPEARL HW40(S)(東ソー:2.6cm×90cm)にかけ、精製水で溶出した。溶出液は前記と同様に分析され、精製ガラクチノールが得られた。

得られたガラクチノールは80mM phosphate buffer(pH6.5)、2mg/ml ガラクチノール、8.3U  $\alpha$ -galactosidase(ベーリンガー・マンハイム社: E.coli overproducer 662038)の条件で25℃、40分保温し、クロロホルム抽出を行なった後、水層をHPLCで分析してガラクトースとmyo-イノシトールに加水分解されることを確認した。

【0030】

実施例2 (ラフィノース合成酵素の活性測定)

ラフィノース合成酵素活性は、L.Lehle and W.Tanner, Eur.J.Biochem., 38, 103頁

-110頁(1973)に準じて、以下の条件で測定された。

蛋白質抽出液2 $\mu$ lを終濃度で100mM Tris-HCl(pH7.4)、5mM DTT、0.01% BSA、200 $\mu$ M sucrose、5mM ガラクチノール、740KBq/ml(31.7 $\mu$ M) [ $^{14}$ C] sucroseとなる反応液18 $\mu$ lに加え、37℃で3時間から20時間行なった。反応後、30 $\mu$ lのエタノールを加えて攪拌し、15,000rpmで5分遠心した。上澄み5 $\mu$ lをHPTLCセルロース薄層クロマト(Merck社HPTLC plates cellulose 10 $\times$ 20cm)にスポットし、n-ブタノール:ピリジン:水:酢酸=60:40:30:3で展開した。展開されたプレートを乾燥した後、生成した [ $^{14}$ C] ラフィノースをイメージングアナライザー(富士写真フイルム社FUJIXバイオ・イメージングアナライザーBAS-2000II)で検出、定量した。

【0031】

### 実施例3 (ラフィノース合成酵素の精製)

以下のようにしてソラマメよりラフィノース合成酵素の精製を行なったが、それぞれの精製蛋白質液について、該蛋白質液中に存在する蛋白質をSDS-PAGE(第一化学薬品製)により分析し、又、その酵素活性を実施例2記載の方法に従って測定した。

-80℃で保存したソラマメ(仁徳一寸)未熟種子300gを解凍後、皮をむき、600mlの100mM Tris-HCl(pH7.4)、5mM DTT、1mM EDTA、1mM PMSF、1mM Benzamideに入れ、氷上で乳鉢ですりつぶした。該破碎物を21,400g、4℃で50分遠心し、得られた上澄みに20分の1の体積の10%polyethylene imine(pH8.0)を加え、4℃で15分攪拌した。そして該混合物を15,700g、4℃で20分遠心し、得られた上澄みに196g/lの $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を攪拌しながら添加した。氷中、30分攪拌した後、15,700g、4℃で20分遠心した。得られた上澄みにさらに142g/lの $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を攪拌しながら添加した。氷中、30分攪拌した後、15,700g、4℃で20分遠心した。得られた沈澱を50mlの100mM Tris-HCl(pH7.4)、5mM DTTで溶解し、20mM Tris-HCl(pH7.4)、1mM DTT、1mM EDTAで4℃で一晩透析した。透析後、懸濁液を70,000g、4℃で60分遠心した。得られた上澄みに1mM Benzamidinium $\cdot$ HCl、5mM  $\epsilon$ -Amino-n-caproic acid、1 $\mu$ g/ml antipain、1 $\mu$ g/ml leupeptin、10mM EGTAを添加した。さらに40分の1の体積の2M KClを少量ずつ添加した後、これを0.05M KCl、20mM Tris-HCl(pH7.4)、1mM DTT、1mM EDTAで平衡化したDEAE-Sephacelカラム(Pharmacia社:2.5 $\times$ 21.5

cm)にかけ、一旦担体に捕獲された蛋白質を0.05から0.5MのKClグラジェントで溶出した。ここまでの精製を3回行ない、ラフィノース合成酵素活性を有する画分をまとめてから以下の精製を行なった。

ラフィノース合成活性を有する溶出画分に4分の1の体積の飽和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を少量ずつ添加した。この溶液を20%飽和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、20mM Tris-HCl(pH7.4)、1mM DTT、1mM EDTAで平衡化したPhenyl-Sepharoseカラム(Pharmacia社:2.5×10.2cm)にかけ、20%から0%の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ グラジェントで溶出した。得られた活性画分に2倍量の0.01M potassium phosphate buffer(pH7.5)を加え、希釈した。この希釈溶液をあらかじめ0.01Mのpotassium phosphate buffer(pH7.5)、2mM DTTで平衡化したEcono-Pac 10DG(BioRad社:5ml)にかけ、0.01Mから0.5Mのpotassium phosphate buffer(pH7.5)、2mM DTTのグラジェントで溶出した。この時点で得られた活性画分は、比活性6500倍以上にまで精製されていた。さらに得られたラフィノース合成酵素活性を有する精製蛋白質溶液の一部を0.2M KCl、20mM Tris-HCl(pH7.4)、1mM DTT、1mM EDTAで平衡化したSuperdexカラム(Pharmacia社:1.6×60cm)にかけた。分取された精製蛋白質をSDS-PAGEにかけ、また、ラフィノース合成酵素活性を測定した。ラフィノース合成酵素活性を有する蛋白質のバンドをSDS-PAGE上で分子量約90kDaと特定した。

#### 【0032】

#### 実施例4 (ラフィノース合成酵素の部分アミノ酸配列の解析)

実施例3においてEcono-Pac 10DG(BioRad社:5ml)により精製された精製蛋白質溶液約1mlに9分の1の体積の100%TCAを加え、氷上で30分放置した。10,000g, 15分遠心した後、得られた沈殿を500 $\mu$ lの-20℃に冷やしたアセトンで懸濁し、遠心して沈殿を回収した。回収された沈殿を前記と同様な方法でアセトン洗浄を行った後、沈殿を回収し、乾燥した。乾燥された沈殿について、該沈殿を200 $\mu$ lのSDS-サンプルバッファーに溶解してから、SDS-PAGEを行なった。電気泳動したゲルをCBB染色し、ラフィノース合成酵素蛋白質のバンドを切り出した。

切り出したゲルに1mlの50%アセトニトリル、0.2M ammonium carbonate(pH8.9)を加え、室温で20分攪拌しながら洗浄した。さらにもう一度同様な方法でゲルを洗浄し、該ゲルを体積が減少する程度まで減圧下乾燥した。次にこのゲルに対し

て、1mlの0.02% Tween-20、0.2M ammonium carbonate(pH8.9)を加え、室温で15分攪拌した。溶液を除いた後、新たに400  $\mu$ lの8M urea、0.4M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ を加えた。さらに40  $\mu$ lの45mMのDTTを添加し、50℃で20分放置した。十分に室温まで戻した後、4  $\mu$ lの1M iodoacetic acidを加え、暗所中、室温で20分攪拌した。溶液を除き1mlの精製水を加え、室温で5分攪拌して洗浄した。さらに2回洗浄を行った後、1mlの50%アセトニトリル、0.2M ammonium carbonate(pH8.9)を加え、室温で15分攪拌した。同様の処理をさらにもう一度行った後、溶液を除去し、ゲルを体積が減少する程度まで減圧下乾燥した。

次にこのゲルに対してAchromobacter ProteaseIの溶液(TAKARA社:Residue-specific Protease kit)を100  $\mu$ l加えた。該ゲルが溶液の表面から出ない程度に0.02% Tween-20、0.2M ammonium carbonate(pH8.9)を加え、37℃で42時間放置した。500  $\mu$ lの0.09% TFA、70%アセトニトリルを加え、室温で30分攪拌した。得られた混合物が入れられたサンプルチューブごと超音波洗浄器の中に浮かし、超音波処理(BRANSON:出力60W)を5分行なった。得られた処理物を遠心し、得られた抽出液を別のシリコンコートしたサンプルチューブに回収した。一方、沈殿には再度500  $\mu$ lの0.09% TFA、70%アセトニトリルを添加し、上記と同様な方法により再抽出を行った。得られた抽出液を合わせて、200~300  $\mu$ l溶液が残る程度にまで減圧下で濃縮した。該濃縮物に25  $\mu$ lの8M 尿素、0.4M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ を加えてから、100  $\mu$ l以下溶液が残る程度にまで減圧下で濃縮した。該濃縮物を精製水で約100  $\mu$ lにし、これをウルトラフリーC3 GV(Millipore社)で濾過した。得られた濾液をAq uapore BU-300 C-4(2.1×300mm)カラムで0.1TFA/2.1%~68.6%のアセトニトリルグラジェントで溶出し、215nmの吸収でモニターしながらピークを分取した。分取したサンプルを減圧下で完全に乾固した後、ABI社プロテインシーケンサー473Aで分析することによりラフィノース合成酵素の部分アミノ酸配列の解析を行った。

### 【0033】

#### 実施例5 (cDNAの作成)

ソラマメ(仁徳一寸)の未熟種子約2gを液体窒素で凍結し、乳鉢で粉砕した。Is ogen(ニッポンジーン社)を20ml加え、さらに良くすりつぶした。該破砕物を遠心

管に移し、4mlのクロロホルムを加え、ボルテックスで攪拌した後、これを4℃で6, 500g10分遠心し、水層を回収した。回収された水層に10mlのイソプロパノールを加えて攪拌した後、4℃で6, 500g 10分遠心した。得られた沈殿を10mlの70%エタノールで洗浄した後、これを1mlのElution buffer (10mM Tris-HCl/pH7.5, 1 mM EDTA, 0.1%SDS)で溶解した。該溶解物を60℃で10分おいた後、10, 000gで1分遠心し、不溶物を除去した。得られた上澄み液に等量のOligotex-dT30を加え、攪拌し、65℃で5分放置した。さらに氷上に移して3分放置した後、5M NaClを200  $\mu$ l加え、混合し、37℃で10分放置した。次にこれを4℃、10, 000gで3分遠心し、沈殿を回収した。回収された沈殿を1mlのTEバッファーで懸濁し、65℃で5分放置した。この懸濁液を氷上に移して3分放置した後、4℃、10, 000gで3分遠心して沈殿を除去した。

得られた上澄み液に100  $\mu$ lの3M酢酸ナトリウムと2mlのエタノールを加えてRNAをエタノール沈澱し、これを回収した。回収されたRNAを70%エタノールで2回洗浄し、これを20  $\mu$ lの滅菌水に溶解し、cDNA合成に用いた。得られたRNAは260nmの吸光度を測定し、定量した。

cDNA合成には、Amersham社のFirst strand synthesis for RT-PCRのキットとTakara社のcDNA Synthesis Kitを用い、すべての操作はプロトコールに従った。

#### 【0034】

#### 実施例6 (cDNAからのラフィノース合成酵素遺伝子の塩基配列の解析)

実施例4により得られたアミノ酸配列に基づき、下記リスト3で示される塩基配列の混合合成DNAプライマーを合成した。PCRは、Clontech社のAdvantage KlenTaq cDNA Kitを用いてパーキンエルマー社のGene Amp PCR Systems 2400とDNA Thermal Cycler Model 480で行なわれた。上記プライマーを用いてPCRで検討を行ったところ、下記リスト4で示される塩基配列を有するプライマー8.2と13.3RV、13.4と10.3RV、そして7.4と10.3RVの組み合わせでそれぞれ1.2kb、0.5kb、1.2kbのバンドの増幅が見られた。増幅されたDNA断片をTAクローニングキット(Invitrogen社)でクローニングし、パーキンエルマー社のABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kitを用いてシーケンス反応を行ない、ABI社373S DNA シーケンサーで解析を行った。その結果、それぞれのDNA断片は、

配列番号2で示される塩基配列における813番目から1915番目まで、1936番目から2413番目まで、1226番目から2413番目までの塩基配列を有することが明らかにされた。この塩基配列をもとに配列番号6で示される塩基配列の合成DNAプライマーを作成し、Clontech社のMarathon cDNA Amplification Kitを用いてcDNAの両端の塩基配列を解析した。その結果、最終的に配列番号2で示される塩基配列が明らかにされた。

【0035】

(リスト3)

#8-2 26mer

AA(AG) AC(ATGC) GC(ATGC) CC(ATGC) AG(TC) AT(TCA) AT(TCA) GAC AA

#13-4 20mer

AA(AG) AT(TCA) TGG AA(TC) CT(ATGC) AAC AA

#7-4 24mer

AA(AG) GC(ATGC) AG(AG) GT(ATGC) GT(ATGC) GT(ATGC) CC(ATGC) AAG

#13-3RV 21mer

(TC)TT (AG)TT (ATGC)AG (AG)TT CCA (AGT)AT TTT

#10-3RV 21mer

(TC)TT (AG)TC (TC)TC (AG)TA (ATGC)AG (AG)AA TTT

【0036】

(リスト4)

RS-2RV 30mer

GGCTGAGGTTTCGGTTCATTCCTGAATCATC

RS-7 30mer

CCAAATGGTACATATTGGCTCCAAGGTTGT

RS-8 30mer

AAGAGTGTATCTGAATTTTCACGCGCGGTG

RS-9 30mer

TGGTGCAATGGGAAAACTCCAATGAGCACC

RS-10 30mer

ATGAAGTGTCTGATAGATTGAAAAGTTTCG

RS-11

30mer

CAGTCTCTGGAGTTTGATGATAATGCAAGT

【0037】

#### 実施例7 (cDNAからのラフィノース合成酵素遺伝子の取得)

実施例5により得られたcDNAを鋳型として、配列番号1で示されるアミノ酸配列に基づき設計されたプライマー、例えば、上記リスト2に示される塩基配列を有するプライマーを用いることでオープンリーディングフレーム領域のDNA断片を増幅する。このとき、それぞれの5'-末端には適当な制限酵素、例えば、BamHI, NcoI, XhoI, PstI, SacI、の認識配列を加えてプライマーを合成する。増幅されたDNA断片はプライマーに含まれる制限酵素の認識配列を用いてStratagene社のpBlue scriptIIにサブクローニングする。クローニングされたDNA断片の塩基配列の確認はパーキンエルマー社のABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kitを用いて行う。

【0038】

#### 【発明の効果】

本発明により、ラフィノース合成酵素遺伝子等を提供することが可能となった。

【0039】

#### (配列の簡単な説明)

##### 1. 配列番号1:

配列番号1に示される配列は、ソラマメより取得されたラフィノース合成酵素遺伝子にコードされるラフィノース合成酵素蛋白質のアミノ酸配列を示す。

##### 2. 配列番号2:

配列番号2に示される配列は、ソラマメより取得されたラフィノース合成酵素遺伝子のcDNA塩基配列を示す。

##### 3. リスト1:

リスト1に示される配列は、ラフィノース合成酵素遺伝子のcDNA断片の増幅に用いられるプライマーの塩基配列の一例を示す。いずれも非翻訳領域の塩基配列



に基づいている。目的に応じて適当にこの塩基配列の5'-末端に適当な制限酵素の認識配列を加えることができる。プライマー1は5'-末端に相当するセンスプライマー、プライマー2と3は3'-末端側に相当し、アンチセンスプライマーである。

#### 4. リスト2:

リスト2に示される配列は、ラフィノース合成酵素遺伝子のcDNAのラフィノース合成酵素蛋白質のアミノ酸配列をコードしているオープンリーディングフレームの両端の塩基配列を示す。プライマー4と5はラフィノース合成酵素蛋白質のN末端に相当するセンスプライマー、プライマー6と7はラフィノース合成酵素蛋白質のC末端に相当するアンチセンスプライマーである。目的に応じて適当にこの配列の5'-末端に適当な制限酵素の認識配列を加えることができる。

#### 5. リスト3:

リスト3に示される配列は、精製されたソラマメのラフィノース合成酵素蛋白質の部分アミノ酸配列に基づいて合成されたプライマーである。括弧内で示した塩基はその塩基の混合物を合成に用いたことを示す。プライマー番号の後のRVはこのプライマーがアンチセンスの配列であることを示す。

#### 6. リスト4:

リスト4に示される配列は、ソラマメのラフィノース合成酵素遺伝子のcDNA塩基配列の両端をRACE法で解析する際に用いたプライマーの配列を示す。プライマー番号の後のRVはこのプライマーがアンチセンスの配列であることを示す。

【0040】

#### 【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 800

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴

起源

生物名:ソラマメ (Vicia faba)

品種名:仁徳一寸

組織の種類:種子

配列の種類:ペプチド

配列

|   |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|
| 1   | 5   | 10  | 15  |
| Met Ala Pro Pro Ser Ile Thr Lys Thr Ala Thr Leu Gln Asp Val Ile |     |     |     |
| 20  | 25  | 30  |     |
| Ser Thr Ile Asp Ile Gly Asn Gly Asn Ser Pro Leu Phe Ser Ile Thr |     |     |     |
| 35  | 40  | 45  |     |
| Leu Asp Gln Ser Arg Asp Phe Leu Ala Asn Gly His Pro Phe Leu Thr |     |     |     |
| 50  | 55  | 60  |     |
| Gln Val Pro Pro Asn Ile Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ala Ser Ser |     |     |     |
| 65  | 70  | 75  | 80  |
| Phe Leu Asn Leu Lys Ser Asn Lys Asp Thr Ile Pro Asn Asn Asn Asn |     |     |     |
| 85  | 90  | 95  |     |
| Thr Met Leu Leu Gln Gln Gly Cys Phe Val Gly Phe Asn Ser Thr Glu |     |     |     |
| 100   | 105 | 110 |     |
| Pro Lys Ser His His Val Val Pro Leu Gly Lys Leu Lys Gly Ile Lys |     |     |     |
| 115   | 120 | 125 |     |
| Phe Met Ser Ile Phe Arg Phe Lys Val Trp Trp Thr Thr His Trp Val |     |     |     |
| 130   | 135 | 140 |     |
| Gly Thr Asn Gly Gln Glu Leu Gln His Glu Thr Gln Met Leu Ile Leu |     |     |     |
| 145   | 150 | 155 | 160 |
| Asp Lys Asn Asp Ser Leu Gly Arg Pro Tyr Val Leu Leu Leu Pro Ile |     |     |     |
| 165   | 170 | 175 |     |
| Leu Glu Asn Thr Phe Arg Thr Ser Leu Gln Pro Gly Leu Asn Asp His |     |     |     |
| 180   | 185 | 190 |     |
| Ile Gly Met Ser Val Glu Ser Gly Ser Thr His Val Thr Gly Ser Ser |     |     |     |

|   |                                     |     |
|---|-------------------------------------|-----|
| 195   | 200                                 | 205 |
| Phe Lys Ala Cys Leu Tyr Ile                                     | His Leu Ser Asn Asp Pro Tyr Ser Ile |     |
| 210   | 215                                 | 220 |
| Leu Lys Glu Ala Val Lys Val Ile Gln Thr Gln Leu Gly Thr Phe Lys |                                     |     |
| 225   | 230                                 | 235 |
| Thr Leu Glu Glu Lys Thr Ala Pro Ser Ile Ile Asp Lys Phe Gly Trp |                                     |     |
| 245   | 250                                 | 255 |
| Cys Thr Trp Asp Ala Phe Tyr Leu Lys Val His Pro Lys Gly Val Trp |                                     |     |
| 260   | 265                                 | 270 |
| Glu Gly Val Lys Ser Leu Thr Asp Gly Gly Cys Pro Pro Gly Phe Val |                                     |     |
| 275   | 280                                 | 285 |
| Ile Ile Asp Asp Gly Trp Gln Ser Ile Cys His Asp Asp Asp Asp Glu |                                     |     |
| 290   | 295                                 | 300 |
| Asp Asp Ser Gly Met Asn Arg Thr Ser Ala Gly Glu Gln Met Pro Cys |                                     |     |
| 305   | 310                                 | 315 |
| Arg Leu Val Lys Tyr Glu Glu Asn Ser Lys Phe Arg Glu Tyr Glu Asn |                                     |     |
| 320   | 325                                 | 330 |
| Pro Glu Asn Gly Gly Lys Lys Gly Leu Gly Gly Phe Val Arg Asp Leu |                                     |     |
| 340   | 345                                 | 350 |
| Lys Glu Glu Phe Gly Ser Val Glu Ser Val Tyr Val Trp His Ala Leu |                                     |     |
| 355   | 360                                 | 365 |
| Cys Gly Tyr Trp Gly Gly Val Arg Pro Gly Val His Gly Met Pro Lys |                                     |     |
| 370   | 375                                 | 380 |
| Ala Arg Val Val Val Pro Lys Val Ser Gln Gly Leu Lys Met Thr Met |                                     |     |
| 385   | 390                                 | 395 |
| Glu Asp Leu Ala Val Asp Lys Ile Val Glu Asn Gly Val Gly Leu Val |                                     |     |
| 405   | 410                                 | 415 |
| Pro Pro Asp Phe Ala His Glu Met Phe Asp Gly Leu His Ser His Leu |                                     |     |
| 420   | 425                                 | 430 |

|   |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|
| Glu Ser Ala Gly Ile Asp Gly Val Lys Val Asp Val Ile His Leu Leu |     |     |     |
| 435   | 440 | 445 |     |
| Glu Leu Leu Ser Glu Glu Tyr Gly Gly Arg Val Glu Leu Ala Arg Ala |     |     |     |
| 450   | 455 | 460 |     |
| Tyr Tyr Lys Ala Leu Thr Ser Ser Val Lys Lys His Phe Lys Gly Asn |     |     |     |
| 465   | 470 | 475 | 480 |
| Gly Val Ile Ala Ser Met Glu His Cys Asn Asp Phe Phe Leu Leu Gly |     |     |     |
| 485   | 490 | 495 |     |
| Thr Glu Ala Ile Ser Leu Gly Arg Val Gly Asp Asp Phe Trp Cys Ser |     |     |     |
| 500   | 505 | 510 |     |
| Asp Pro Ser Gly Asp Pro Asn Gly Thr Tyr Trp Leu Gln Gly Cys His |     |     |     |
| 515   | 520 | 525 |     |
| Met Val His Cys Ala Tyr Asn Ser Leu Trp Met Gly Asn Phe Ile Gln |     |     |     |
| 530   | 535 | 540 |     |
| Pro Asp Trp Asp Met Phe Gln Ser Thr His Pro Cys Ala Glu Phe His |     |     |     |
| 545   | 550 | 555 | 560 |
| Ala Ala Ser Arg Ala Ile Ser Gly Gly Pro Ile Tyr Val Ser Asp Cys |     |     |     |
| 565   | 570 | 575 |     |
| Val Gly Asn His Asn Phe Lys Leu Leu Lys Ser Leu Val Leu Pro Asp |     |     |     |
| 580   | 585 | 590 |     |
| Gly Ser Ile Leu Arg Cys Gln His Tyr Ala Leu Pro Thr Arg Asp Cys |     |     |     |
| 595   | 600 | 605 |     |
| Leu Phe Glu Asp Pro Leu His Asn Gly Lys Thr Met Leu Lys Ile Trp |     |     |     |
| 610   | 615 | 620 |     |
| Asn Leu Asn Lys Tyr Thr Gly Val Leu Gly Leu Phe Asn Cys Gln Gly |     |     |     |
| 625   | 630 | 635 | 640 |
| Gly Gly Trp Cys Pro Glu Ala Arg Arg Asn Lys Ser Val Ser Glu Phe |     |     |     |
| 645   | 650 | 655 |     |
| Ser Arg Ala Val Thr Cys Tyr Ala Ser Pro Glu Asp Ile Glu Trp Cys |     |     |     |

|   |     |     |
|---|-----|-----|
| 660   | 665 | 670 |
| Asn Gly Lys Thr Pro Met Ser Thr Lys Gly Val Asp Phe Phe Ala Val |     |     |
| 675   | 680 | 685 |
| Tyr Phe Phe Lys Glu Lys Lys Leu Arg Leu Met Lys Cys Ser Asp Arg |     |     |
| 690   | 695 | 700 |
| Leu Lys Val Ser Leu Glu Pro Phe Ser Phe Glu Leu Met Thr Val Ser |     |     |
| 705   | 710 | 715 |
| Pro Val Lys Val Phe Ser Lys Arg Phe Ile Gln Phe Ala Pro Ile Gly |     |     |
| 725   | 730 | 735 |
| Leu Val Asn Met Leu Asn Ser Gly Gly Ala Ile Gln Ser Leu Glu Phe |     |     |
| 740   | 745 | 750 |
| Asp Asp Asn Ala Ser Leu Val Lys Ile Gly Val Arg Gly Cys Gly Glu |     |     |
| 755   | 760 | 765 |
| Met Ser Val Phe Ala Ser Glu Lys Pro Val Cys Cys Lys Ile Asp Gly |     |     |
| 770   | 775 | 780 |
| Val Lys Val Lys Phe Leu Tyr Glu Asp Lys Met Ala Arg Val Gln Ile |     |     |
| 785   | 790 | 795 |
| Leu Trp Pro Ser Ser Ser Thr Leu Ser Leu Val Gln Phe Leu Phe *** |     |     |

【0041】

配列番号：2

配列の長さ：2746

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列の特徴

特徴を表す記号：peptide

存在位置：101..2500

特徴を決定した方法：E

配列

AATTTTCAAG CATAGCCAAG TTAACCACCT TAGAAACATT CCTACAAGCT ACTTATCCCT 60  
 GTCAATAAGC TACTAAGCTA CCAGAGTCTC ATCAATCACC 100  
 ATG GCA CCA CCA AGC ATA ACC AAA ACT GCA ACC CTC CAA GAC GTA ATA 148  
 AGC ACC ATC GAT ATT GGT AAT GGT AAC TCA CCC TTA TTC TCC ATA ACC 196  
 TTA GAC CAA TCA CGT GAC TTC CTT GCA AAT GGC CAC CCT TTC CTC ACC 244  
 CAA GTC CCA CCT AAC ATA ACA ACA ACA ACA ACC ACT GCT TCC TCT 292  
 TTT CTC AAT CTC AAA TCC AAC AAA GAT ACC ATT CCC AAC AAC AAC AAC 340  
 ACC ATG TTG TTG CAA CAA GGT TGT TTC GTT GGT TTC AAC TCC ACC GAA 388  
 CCC AAA AGC CAC CAC GTA GTT CCA CTC GGC AAA CTA AAA GGA ATC AAA 436  
 TTC ATG AGC ATA TTC CGG TTC AAA GTT TGG TGG ACA ACT CAC TGG GTC 484  
 GGA ACA AAT GGA CAG GAA CTA CAA CAC GAA ACA CAA ATG TTA ATC CTG 532  
 GAC AAA AAC GAC TCC CTC GGA CGA CCC TAT GTC TTA CTC CTC CCA ATC 580  
 CTA GAA AAC ACC TTC CGA ACC TCA CTC CAA CCC GGT CTC AAC GAT CAC 628  
 ATA GGC ATG TCC GTC GAA AGC GGT TCA ACA CAT GTC ACC GGG TCA AGC 676  
 TTC AAA GCA TGT CTT TAC ATC CAT CTC AGT AAC GAC CCA TAC AGT ATA 724  
 CTA AAA GAA GCA GTT AAA GTA ATC CAA ACT CAG TTA GGA ACA TTC AAG 772  
 ACT CTT GAA GAA AAA ACA GCA CCT AGT ATT ATA GAC AAA TTC GGT TGG 820  
 TGC ACG TGG GAT GCT TTT TAC TTG AAG GTT CAT CCA AAA GGT GTA TGG 868  
 GAA GGT GTA AAG TCT CTC ACA GAT GGT GGT TGT CCT CCC GGT TTC GTC 916  
 ATA ATC GAC GAC GGT TGG CAA TCC ATT TGT CAT GAC GAT GAC GAT GAA 964  
 GAT GAT TCA GGA ATG AAC CGA ACC TCA GCC GGG GAA CAA ATG CCA TGC 1012  
 AGA CTT GTA AAA TAC GAA GAG AAT TCT AAG TTT AGA GAA TAT GAG AAT 1060  
 CCT GAA AAT GGA GGG AAG AAA GGT TTG GGT GGT TTT GTG AGG GAT TTG 1108  
 AAG GAA GAG TTT GGG AGT GTG GAG AGT GTT TAT GTT TGG CAT GCG CTT 1156  
 TGT GGG TAT TGG GGC GGG GTT AGG CCT GGA GTG CAT GGG ATG CCG AAA 1204  
 GCT AGG GTT GTT GTT CCG AAG GTG TCT CAG GGG TTG AAG ATG ACG ATG 1252  
 GAG GAT TTG GCG GTG GAT AAG ATT GTT GAG AAC GGT GTG GGG CTA GTG 1300  
 CCG CCA GAT TTT GCA CAT GAG ATG TTT GAT GGG CTT CAC TCT CAT TTG 1348

GAG TCG GCG GGA ATT GAC GGT GTT AAA GTT GAT GTT ATC CAT CTG CTT 1396  
 GAG TTA CTA TCA GAG GAA TAT GGT GGA CGA GTT GAG CTA GCA AGA GCT 1444  
 TAT TAC AAA GCA CTA ACC TCA TCA GTG AAG AAA CAT TTC AAA GGC AAT 1492  
 GGT GTA ATT GCT AGC ATG GAG CAT TGC AAC GAC TTC TTT CTC CTC GGC 1540  
 ACC GAA GCC ATA TCC CTC GGC CGC GTC GGA GAT GAT TTT TGG TGC TCT 1588  
 GAT CCA TCT GGT GAT CCA AAT GGT ACA TAT TGG CTC CAA GGT TGT CAC 1636  
 ATG GTA CAT TGT GCC TAC AAC AGT TTA TGG ATG GGA AAT TTC ATT CAG 1684  
 CCA GAT TGG GAC ATG TTT CAG TCC ACT CAT CCT TGT GCT GAA TTT CAT 1732  
 GCC GCC TCA CGA GCC ATA TCC GGC GGA CCA ATT TAT GTT AGT GAT TGT 1780  
 GTT GGT AAT CAC AAT TTC AAG TTG CTC AAA TCT CTT GTT TTG CCC GAT 1828  
 GGT TCT ATC TTG CGT TGT CAA CAT TAC GCA CTC CCT ACA AGA GAT TGC 1876  
 TTG TTT GAA GAC CCT TTG CAT AAT GGC AAA ACA ATG CTG AAA ATT TGG 1924  
 AAT CTC AAC AAA TAT ACA GGT GTT TTG GGT CTT TTC AAC TGC CAA GGT 1972  
 GGT GGG TGG TGT CCT GAG GCA CGG CGA AAC AAG AGT GTA TCT GAA TTT 2020  
 TCA CGC GCG GTG ACA TGT TAT GCA AGT CCC GAA GAC ATT GAA TGG TGC 2068  
 AAT GGG AAA ACT CCA ATG AGC ACC AAA GGT GTG GAT TTT TTT GCT GTG 2116  
 TAT TTT TTC AAG GAG AAG AAA TTG AGG CTC ATG AAG TGT TCT GAT AGA 2164  
 TTG AAA GTT TCG CTT GAG CCA TTT AGT TTT GAG CTA ATG ACA GTG TCT 2212  
 CCA GTG AAA GTG TTT TCG AAA AGG TTT ATA CAG TTT GCA CCG ATT GGG 2260  
 TTA GTG AAC ATG CTG AAC TCT GGT GGT GCG ATT CAG TCT CTG GAG TTT 2308  
 GAT GAT AAT GCA AGT TTG GTC AAG ATT GGG GTG AGA GGT TGC GGG GAG 2356  
 ATG AGC GTG TTT GCG TCT GAG AAA CCG GTT TGC TGC AAA ATT GAT GGG 2404  
 GTT AAG GTG AAA TTT CTT TAT GAG GAC AAA ATG GCA AGA GTT CAA ATT 2452  
 CTG TGG CCT AGT TCT TCA ACA TTG TCT TTG GTC CAG TTT TTA TTT TGA 2500  
 TCCCTAGGAA TCCTATGCAC GTGTCTCTGT TTACAAGTAC TTTATATAAG TATAATATGT 2560  
 ATCTATTTCC ATTTTAACT GTCTTTATGC AATTAGGTGG TCAATTAGTTA TTTGTTTGT 2620  
 GAAGTAACTA ACTTGCTTGT GTTGTAAGCT TATAATATAT GGTCAAGTTCC TCACTTGTA 2680  
 TATACCTGTT GTATGTATAA ATTTTACTAT ATATGACTAA CATCATTATCT TGTGAGCAA 2740  
 AAAAAA 2746

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、塩基配列にコードされるアミノ酸の対応を示すコドン表である。コドンは、'5-末端が左側にくるように示し、mRNAにおける塩基配列を示している。UはRNAにおけるウラシル塩基を示しており、DNAにおいてはチミン塩基に相当する。



【書類名】 図面

【図1】

|     |     |     |     |      |     |      |     |
|-----|-----|-----|-----|------|-----|------|-----|
| Phe | UUU | Ser | UCU | Tyr  | UAU | Cys  | UGU |
|     | UUC |     | UCC |      | UAC |      | UGC |
| Leu | UUA | Pro | UCA | Stop | UAA | Stop | UGA |
|     | UUG |     | UCG |      | UAG |      | UGG |
|     | CUU |     | CCU | CAU  | His | Arg  | CGU |
|     | CUC |     | CCC | CAC  |     |      | CGC |
| CUA | CCA | CAA | Gln | CGA  |     |      |     |
| CUG | CCG | CAG |     | CGG  |     |      |     |
| Ile | AUU | Thr | ACU | Asn  | AAU | Ser  | AGU |
|     | AUC |     | ACC |      | AAC |      | AGC |
| Met | AUA |     | ACA | Lys  | AAA | Arg  | AGA |
|     | AUG |     | ACG |      | AAG |      | AGG |
| Val | GUU | Ala | GCU | Asp  | GAU | Gly  | GGU |
|     | GUC |     | GCC |      | GAC |      | GGC |
|     | GUA |     | GCA | GAA  | GGA |      |     |
|     | GUG |     | GCG | GAG  | GGG |      |     |

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

ラフィノース合成酵素遺伝子等を提供すること。

【解決手段】

植物から得られる約2.7kbpの遺伝子であり、ショ糖分子中のD-グルコース残基の6位炭素原子に結合するヒドロキシル基にD-ガラクトシル基を $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6)結合させることによりラフィノースを生成させる能力を有する酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有することを特徴とするラフィノース合成酵素遺伝子等。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】  
【識別番号】 000002093  
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号  
【氏名又は名称】 住友化学工業株式会社  
【代理人】 申請人  
【識別番号】 100093285  
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号 住友化学工業株式会社内  
【氏名又は名称】 久保山 隆  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100094477  
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号 住友化学工業株式会社内  
【氏名又は名称】 神野 直美

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002093]

1. 変更年月日 1990年 8月28日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号

氏 名 住友化学工業株式会社



RECEIVED

JUN 12 2002

*Part of  
Paper # 27*

TECH CENTER 1600/2900

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant: Eijiro WATANABE, et al.      Group Art Unit: 1638  
Serial No.: 08/992,914      Examiner: D. Kruse  
Filed: December 18, 1997  
For: RAFFINOSE SYNTHASE GENES AND THEIR USE

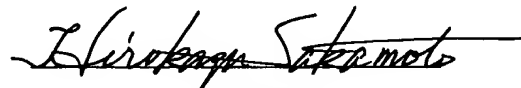
**VERIFICATION OF ENGLISH TRANSLATION**

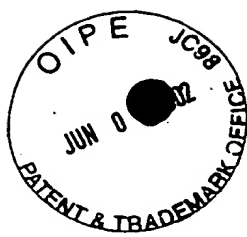
Honorable Commissioner of  
Patents and Trademarks  
Washington, D.C. 20231

Sir:

I, Hirokazu SAKAMOTO, declare that I am conversant in both the Japanese and English languages and that the English translation as attached hereto is an accurate translation of Japanese Patent Application No. 338673/1996 filed on December 18, 1996.

Signed this 15th day of May, 2002.

  
Hirokazu SAKAMOTO



PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

RECEIVED  
JUN 12 2002  
TECH CENTER 1600/2900

This is to certify that the annexed is a true copy of the  
following application as filed with this Office.

Date of Application: December 18, 1996  
Application Number: 338673/1996  
Applicant(s): Sumitomo Chemical Company, Limited

December 22, 1997

Commissioner,  
Patent Office Hisamitsu ARAI (SEAL)

Document Name: Application for Patent  
Docket No.: P147857  
Date of Application: December 18, 1996  
Addressee: Commissioner, Patent Office  
International Patent  
Classification: C12N 9/00  
C12N 15/52  
Title of Invention: RAFFINOSE SYNTHASE GENES AND THEIR USE  
Number of Claim(s): 25  
Inventor(s):

Address: c/o Sumitomo Chemical Company, Limited  
2-1, Takatsukasa 4-chome, Takarazuka-shi,  
Hyogo-ken  
Name: Eihiro WATANABE

Address: c/o Sumitomo Chemical Company, Limited  
2-1, Takatsukasa 4-chome, Takarazuka-shi,  
Hyogo-ken  
Name: Kenji OEDA

Applicant(s):

Identification No.: 000002093  
Name: Sumitomo Chemical Company, Limited  
Representative: Akio KOSAI

Patent Attorney(ies):

Identification No.: 100093285  
Name: Takashi KUBOYAMA  
Phone: 06-220-3404

Identification No.: 100094477  
Name: Naoyoshi JINNO  
Phone: 06-220-3404

Payment of Fees:

Prepayment Book No.: 010238  
Amount to be paid: 21,000 yen

Attached document:

|       |               |        |
|-------|---------------|--------|
| Item: | Specification | 1 copy |
| Item: | Drawing       | 1 copy |
| Item: | Abstract      | 1 copy |

General Power:

Identification No.: 9004612

Identification No.: 9203867

Request for proof  
transmission:

Yes



[Document Name] Specification

[Title of Invention] RAFFINOSE SYNTHASE GENES AND THEIR USE

[Claims]

[Claim 1]

A raffinose synthase gene characterized in that it is an about 2.7 kbp gene isolated from a plant and it has a nucleotide sequence coding for an amino acid sequence of an enzyme capable of producing raffinose by combining a D-galactosyl group through an  $\alpha(1\rightarrow6)$  bond with a hydroxyl group attached to the carbon atom at position 6 of a D-glucose residue in a sucrose molecule.

[Claim 2]

A raffinose synthase gene characterized in that it is a gene hybridizing to a nucleotide sequence coding for the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 and it has a nucleotide sequence coding for an amino acid sequence of an enzyme capable of producing raffinose by combining a D-galactosyl group through an  $\alpha(1\rightarrow6)$  bond with a hydroxyl group attached to the carbon atom at position 6 of a D-glucose residue in a sucrose molecule.

[Claim 3]

The raffinose synthase gene according to claim 1 or 2, characterized in that the plant is a leguminous plant.

[Claim 4]

The raffinose synthase gene according to claim 3, characterized in that the leguminous plant is broad bean.

[Claim 5]

A raffinose synthase gene characterized in that it has a nucleotide sequence coding for the amino acid sequence of SEQ ID NO:1.

[Claim 6]

A raffinose synthase gene characterized in that it has the nucleotide sequence of SEQ ID NO:2.

[Claim 7]

A raffinose synthase protein characterized in that it has amino acid sequence (a) or (b) as defined below:

(a) the amino acid sequence of SEQ ID NO:1;

(b) an amino acid sequence derived by deletion, replacement, modification or addition of one or several amino acids in the amino acid sequence of SEQ ID NO:1,

and it is capable of producing raffinose by combining a D-galactosyl group through an  $\alpha(1\rightarrow6)$  bond with a hydroxyl group attached to the carbon atom at position 6 of a D-glucose residue in a sucrose molecule.

[Claim 8]

The raffinose synthase gene characterized in that it has the amino acid sequence of SEQ ID NO:1.

[Claim 9]

A gene fragment characterized in that it has a partial nucleotide sequence of the raffinose synthase gene according to claim 1, 2, 3 or 4.

[Claim 10]

A gene fragment characterized in that it has a partial nucleotide sequence of the raffinose synthase gene according to claim 5 or 6.

[Claim 11]

A gene fragment according to claim 9 or 10, characterized in that the number of nucleotides ranges from 15 to 50.

[Claim 12]

A method for the detection of a raffinose synthase gene, characterized in that a raffinose synthase gene or a gene fragment thereof, having a nucleotide sequence coding for the amino acid sequence of an enzyme capable of producing raffinose by combining a D-galactosyl group through an  $\alpha(1\rightarrow6)$  bond with a hydroxyl group attached to the carbon atom at position 6 of a D-glucose residue in a sucrose molecule, is detected from plant gene fragments by the hybridization method with the gene fragment of claim 9, 10 or 11 as a probe.

[Claim 13]

A method for the amplification of a raffinose synthase gene, characterized in that a raffinose synthase gene or a gene fragment thereof, having a nucleotide sequence coding for the amino acid sequence of an enzyme capable of producing raffinose by combining a D-galactosyl group through an  $\alpha(1\rightarrow6)$  bond with a hydroxyl group attached to the carbon atom at position 6 of a D-glucose residue in a sucrose molecule, is amplified by the PCR (polymerase chain reaction) method for plant gene fragments with the gene fragment of claim 9, 10 or 11 as a primer.

[Claim 14]

A method for obtaining a raffinose synthase gene, characterized in that a raffinose synthase gene or a gene fragment thereof is identified by the method of claim 12 or 13; and the gene or the gene fragment thereof identified is isolated and purified.

[Claim 15]

A raffinose synthase gene characterized in that it is obtained by identifying a DNA fragment containing a raffinose synthase gene or a gene fragment thereof by the method of claim 12 or 13, and isolating and purifying the gene or the gene fragment thereof identified.

[Claim 16]

A chimera gene characterized in that it comprises a promoter upstream the raffinose synthase gene of claim 1, 2, 3, 4, 5, 6 or 15.

[Claim 17]

A transformant characterized in that it is obtained by introducing the chimera gene of claim 16 into a host organism.

[Claim 18]

A plasmid characterized in that it comprises the raffinose synthase gene of claim 1, 2, 3, 4, 5, 6 or 15.

[Claim 19]

A host organism characterized in that it has been transformed with the plasmid

of claim 18, or a cell thereof.

[Claim 20]

A microorganism characterized in that it has been transformed with the plasmid of claim 18.

[Claim 21]

A plant characterized in that it has been transformed with the plasmid of claim 18, or a cell thereof.

[Claim 22]

A method for metabolic modification, characterized in that the raffinose synthase gene of claim 1, 2, 3, 4, 5, 6 or 15 is introduced into a host organism or a cell thereof, so that the content of raffinose family oligosaccharides in the host organism or the cell thereof is changed.

[Claim 23]

A method for the production of a raffinose synthase protein, characterized in that a raffinose synthase protein is isolated and purified from a culture obtained by cultivating the microorganism of claim 20.

[Claim 24]

An anti-raffinose synthase antibody characterized in that it is capable of binding to the raffinose synthase protein of claim 7 or 8.

[Claim 25]

A method for the detection of a raffinose synthase protein, characterized in that a test protein is treated with the anti-raffinose synthase antibody of claim 24 and the raffinose synthase protein is detected by antigen-antibody reaction between the antibody and the raffinose synthase protein.

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Technical Field of the Invention]

The present invention relates to raffinose synthase genes and others.

[0002]

[Prior Art]

Raffinose family oligosaccharides are derivatives of sucrose, which are represented by  $\alpha$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6) n- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-fluctofuranoside as the general formula, and they are designated "raffinose" when n = 1, "stachyose" when n = 2, "verbascose" when n = 3, and "ajugose" when n = 4.

The greatest contents of such raffinose family oligosaccharides are found in plants, except for sucrose, and it has been known that they are contained not only in higher plants including gymnosperms such as pinaceous plants (e.g., spruce) and angiosperms such as leguminous plants (e.g., soybean, kidney bean), brassicaceous plants (e.g., rape), chenopodiaceous plants (e.g., sugar beet), malvaceous plants (e.g., cotton), and salicaceous plants (e.g., poplar), but also in chlorella. Thus, they occur widely in the plant kingdom.

Raffinose family oligosaccharides play a role, for example, as reserve sugars in the storage organs or seeds of many plants or as translocating sugars in the phenomenon of sugar transportation between the tissues of some plants.

Furthermore, it has been known that plants, when exposed to low temperatures, accumulate raffinose family oligosaccharides in their cells to tolerate low temperature stress.

On the other hand, it has been known that raffinose family oligosaccharides have an effect of giving good conditions of enterobacterial flora. Therefore, raffinose family oligosaccharides have already been used as a functional food material for addition to some kinds of food and utilized in the field of specified healthful food.

Raffinose family oligosaccharides having such a role and utility are produced by the raffinose oligosaccharide synthesis system beginning with sucrose in many plants. This biosynthesis system usually involves a reaction for the sequential addition of galactosyl groups from galactotinol through an  $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6) bond to a hydroxyl group attached to the carbon atom at position 6 of a D-glucose residue in a sucrose molecule.

In the first step of this biosynthesis system, raffinose synthase is an enzyme concerned in the reaction of raffinose production by combining a D-galactosyl group from galactotinol through an  $\alpha(1\rightarrow6)$  bond with a hydroxyl group attached to the carbon atom at position 6 of a D-glucose residue in a sucrose molecule.

It has been suggested that this enzyme constitutes a rate limiting step in the above synthesis system, and it has been revealed that this enzyme is quite important in the control of biosynthesis of raffinose family oligosaccharides.

[0003]

[Problems to be Solved by the Invention]

However, raffinose synthase, although the presence of this enzyme itself was already confirmed in many plants by the measurement of its activity with a biochemical technique, has not yet been successfully isolated and purified as a homogeneous protein. In addition, the amino acid sequence of this enzyme is still unknown, and no report has been made on an attempt at beginning to isolate a gene coding for this enzyme.

[0004]

[Means of Solving the Problems]

Under these circumstances, the present inventors have intensively studied and finally succeeded in isolating a raffinose synthase and a gene coding for this enzyme from broad bean, thereby completing the present invention.

Thus, the present invention provides the following:

1) A raffinose synthase gene characterized in that it is an about 2.7 kbp gene isolated from a plant and it has a nucleotide sequence coding for an amino acid sequence of a protein capable of producing raffinose by combining a D-galactosyl group through an  $\alpha(1\rightarrow6)$  bond with a hydroxyl group attached to the carbon atom at position 6 of a D-glucose residue in a sucrose molecule.

2) A raffinose synthase gene characterized in that it is a gene hybridizing to a nucleotide sequence coding for the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 and it has a nucleotide sequence coding for an amino acid sequence of a protein capable of producing

raffinose by combining a D-galactosyl group through an  $\alpha(1\rightarrow6)$  bond with a hydroxyl group attached to the carbon atom at position 6 of a D-glucose residue in a sucrose molecule.

3) The raffinose synthase gene according to item 1 or 2, characterized in that the plant is a leguminous plant.

4) The raffinose synthase gene according to item 3, characterized in that the leguminous plant is broad bean.

5) A raffinose synthase gene characterized in that it has a nucleotide sequence coding for the amino acid sequence of SE ID NO:1.

6) A raffinose synthase gene characterized in that it has the nucleotide sequence of SEQ ID NO:2.

7) A raffinose synthase protein characterized in that it has amino acid sequence (a) or (b) as defined below:

(a) the amino acid sequence of SEQ ID NO:1;

(b) an amino acid sequence derived by deletion, replacement, modification or addition of one or several amino acids in the amino acid sequence of SEQ ID NO:1,

and it is capable of producing raffinose by combining a D-galactosyl group through an  $\alpha(1\rightarrow6)$  bond with a hydroxyl group attached to the carbon atom at position 6 of a D-glucose residue in a sucrose molecule.

8) The raffinose synthase gene characterized in that it has the amino acid sequence of SEQ ID NO:1.

9) A gene fragment characterized in that it has a partial nucleotide sequence of the raffinose synthase gene according to item 1, 2, 3 or 4.

10) A gene fragment characterized in that it has a partial nucleotide sequence of the raffinose synthase gene according to item 5 or 6.

11) A gene fragment according to item 9 or 10, characterized in that the number of nucleotides ranges from 15 to 50.

12) A method for the detection of a raffinose synthase gene, characterized in

that a raffinose synthase gene or a gene fragment thereof, having a nucleotide sequence coding for the amino acid sequence of an enzyme capable of producing raffinose by combining a D-galactosyl group through an  $\alpha(1\rightarrow6)$  bond with a hydroxyl group attached to the carbon atom at position 6 of a D-glucose residue in a sucrose molecule, is detected from plant gene fragments by the hybridization method with the gene fragment of item 9, 10 or 11 as a probe.

13) A method for the amplification of a raffinose synthase gene, characterized in that a raffinose synthase gene or a gene fragment thereof, having a nucleotide sequence coding for the amino acid sequence of an enzyme capable of producing raffinose by combining a D-galactosyl group through an  $\alpha(1\rightarrow6)$  bond with a hydroxyl group attached to the carbon atom at position 6 of a D-glucose residue in a sucrose molecule, is amplified by the PCR (polymerase chain reaction) method for plant gene fragments with the gene fragment of item 9, 10 or 11 as a primer.

14) A method for obtaining a raffinose synthase gene, characterized in that a raffinose synthase gene or a gene fragment thereof is identified by the method of item 12 or 13; and the gene or the gene fragment thereof identified is isolated and purified.

15) A raffinose synthase gene characterized in that it is obtained by identifying a DNA fragment containing a raffinose synthase gene or a gene fragment thereof by the method of item 12 or 13, and isolating and purifying the gene or the gene fragment thereof identified.

16) A chimera gene characterized in that it comprises a promoter upstream the raffinose synthase gene of item 1, 2, 3, 4, 5, 6 or 15.

17) A transformant characterized in that it is obtained by introducing the chimera gene of item 16 into a host organism.

18) A plasmid characterized in that it comprises the raffinose synthase gene of item 1, 2, 3, 4, 5, 6 or 15.

19) A host organism characterized in that it has been transformed with the plasmid of item 18, or a cell thereof.



20) A microorganism characterized in that it has been transformed with the plasmid of item 18.

21) A plant characterized in that it has been transformed with the plasmid of item 18, or a cell thereof.

22) A method for metabolic modification, characterized in that the raffinose synthase gene of item 1, 2, 3, 4, 5, 6 or 15 is introduced into a host organism or a cell thereof, so that the content of raffinose family oligosaccharides in the host organism or the cell thereof is changed.

23) A method for the production of a raffinose synthase protein, characterized in that a raffinose synthase protein is isolated and purified from a culture obtained by cultivating the microorganism of item 20.

24) An anti-raffinose synthase antibody characterized in that it is capable of binding to the raffinose synthase protein of item 7 or 8.

25) A method for the detection of a raffinose synthase protein, characterized in that a test protein is treated with the anti-raffinose synthase antibody of item 24 and the raffinose synthase protein is detected by antigen-antibody reaction between the antibody and the raffinose synthase protein.

[0005]

#### [Mode for Carrying Out the Invention]

The present invention will hereinafter be illustrated. The gene engineering methods described below can be carried out according to ordinary methods, for example, as described in "Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition" (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0-87969-309-6; "Current Protocols In Molecular Biology" (1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN 0-471-50338-X; and "Current Protocols In Protein Science" (1995), John Wiley & Sons, Inc. ISBN 0-471-11184-8.

[0006]

The term "raffinose synthase gene" as used herein (hereinafter referred to as the present gene) refers to, for example, a "gene that is an about 2.7 kbp gene obtained

from a plant and that has a nucleotide sequence coding for an amino acid sequence of an enzyme capable of producing raffinose by combining a D-galactosyl group through an  $\alpha(1\rightarrow6)$  bond with a hydroxyl group attached to the carbon atom at position 6 of a D-glucose residue in a sucrose molecule” or a “gene that is a gene hybridizing to a nucleotide sequence coding for the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 and that has a nucleotide sequence coding for an amino acid sequence of an enzyme capable of producing raffinose by combining a D-galactosyl group through an  $\alpha(1\rightarrow6)$  bond with a hydroxyl group attached to the carbon atom at position 6 of a D-glucose residue in a sucrose molecule.”

The wording “hybridizing to” as used herein means that after double-stranded DNA is dissociated into complementary single-stranded DNAs by heat treatment at 95°C for 1 minute or by alkali treatment with 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl, the single-stranded DNAs can be associated with complementary single-stranded DNA or single-stranded RNA to take a double-strand state again, for example, by cooling or leaving them on ice for 1 minute, or by neutralization with 0.5 M Tris·HCl (pH 7.0), 3.0 M NaCl. The wording “gene hybridizing to” as used herein refers to a gene having complementarity as described above. More specifically, it may include, for example, a gene having a nucleotide sequence coding for an amino acid sequence having about 50% or higher homology in the region corresponding to the length of 400 or more amino acid residues, among the nucleotide sequences coding for the amino acid sequence of SEQ ID NO:1.

The present gene may include, for example, raffinose synthase genes from leguminous plants such as broad bean (*Vicia faba*). More specifically, the present gene may include, for example, a “raffinose synthase gene having a nucleotide sequence coding for the amino acid sequence of SEQ ID NO:1” and a “raffinose synthase gene having the nucleotide sequence of SEQ ID NO:2.”

[0007]

The present gene can be obtained, for example, by the following method.

The tissues such as seeds or leaves of a leguminous plant, e.g., broad bean

(*Vicia faba*), are collected, and the collected tissues are frozen in liquid nitrogen and then ground physically with a mortar or other means into finely powdered tissue debris. From the tissue debris, RNA is extracted by an ordinary method. Commercially available RNA extraction kits can be utilized in the extraction. The whole RNA is separated from the RNA extract by ethanol precipitation. From the whole RNA separated, poly-A tailed RNA is fractionated by an ordinary method. Commercially available oligo-dT columns can be utilized in the fractionation. cDNA is synthesized from the fraction obtained (i.e., poly-A tailed RNA) by an ordinary method. Commercially available cDNA synthesis kits can be utilized in the synthesis. Using the cDNA as a template, the cDNA fragments of the present gene can be obtained, for example, by PCR with the primers shown in list 1 below. The primers used at this time can be designed on the basis of the nucleotide sequence of SEQ ID NO:2, depending upon the purpose. For example, if they are designed as the nucleotide sequences shown in list 2 below, the open reading frame region can be amplified. The amplified DNA fragments can be subcloned according to ordinary methods, for example, as described in "Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition" (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press; and "Current Protocols In Molecular Biology" (1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN 0-471-50338-X. More specifically, cloning can be effected, for example, using a TA cloning kit of Invitrogen and a plasmid vector such as pBluescript II of Stratagene. The nucleotide sequences of the DNA fragments cloned can be determined by the dideoxy terminating method, for example, as described by F. Sanger, S. Nicklen, A.R. Coulson, Proceedings of National Academy of Science U.S.A. (1977), 74, pp. 5463-5467. For example, ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit commercially available from Perkin-Elmer may preferably be used.

[0008]

(List 1)

Primer 1: AATTTTCAAG CATAGCCAAG TTAACCACCT 30 mer

Primer 2: GCTCACAAGA TAATGATGTT AGTC 24 mer

Primer 3: ATACAAGTGA GGAACCTTGAC CA 22 mer

[0009]

(List 2)

Primer 4: ATGGCACCAC CAAGCATAAC CAAAACCTGC 29 mer

Primer 5: ATGGCACCAC CAAGCATAAC CAAAACCTGCA ACCCTCCAAG ACG 43 mer

Primer 6: TCAAAATAAA AACTGGACCA AAGAC 25 mer

Primer 7: TCAAAATAAA AACTGGACCA AAGACAATGT 30 mer

[0010]

The term "gene fragment" as used herein (hereinafter referred to as the present gene fragment) refers to a gene fragment having a partial nucleotide sequence of the present gene. For example, it may be a "gene fragment having a partial nucleotide sequence of the gene that is an about 2.7 kbp gene isolated from a plant and that has a nucleotide sequence coding for the amino acid sequence of an enzyme capable of producing raffinose by combining a D-galactosyl group through an  $\alpha(1\rightarrow6)$  bond with a hydroxyl group attached to the carbon atom at position 6 of a D-glucose residue in a sucrose molecule" and a "gene fragment having a partial nucleotide sequence of the gene that is a gene hybridizing to a nucleotide sequence coding for the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 and that has a nucleotide sequence coding for the amino acid sequence of an enzyme capable of producing raffinose by combining a D-galactosyl group through an  $\alpha(1\rightarrow6)$  bond with a hydroxyl group attached to the carbon atom at position 6 of a D-glucose residue in a sucrose molecule." Specific examples of the present gene fragment are a "gene fragment having a partial nucleotide sequence of the gene having a nucleotide sequence coding for the amino acid sequence of SEQ ID NO:1" and a "gene fragment having a partial nucleotide sequence of the gene having a nucleotide sequence of SEQ ID NO:2."

These gene fragments are useful as probes in the hybridization method or as primers in the PCR (polymerase chain reaction) method. In particular, for the primers in the PCR method, gene fragments are preferred to have the number of nucleotides ranging

from 15 to 50.

[0011]

The present gene fragment can be used as a probe in the hybridization method to detect from plant gene libraries, a raffinose synthase gene having a nucleotide sequence coding for the amino acid sequence of an enzyme capable of producing raffinose by combining a D-galactosyl group through an  $\alpha(1\rightarrow6)$  bond with a hydroxyl group attached to the carbon atom at position 6 of a D-glucose residue in a sucrose molecule, or a gene fragment thereof (hereinafter referred to as the present detection method).

[0012]

More specifically, this can be achieved by the methods, for example, such as described in "Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition" (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press; or "Current Protocols In Molecular Biology" (1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN 0-471-50338-X. The plant gene library used herein may include, for example, genomic cDNA libraries such as cDNA libraries derived from the desired plant. As the plant gene library, a commercially available library can be used just as derived from a plant, or a library can also be used, which has been prepared according to an ordinary library preparation method described in "Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition" (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press; or "Current Protocols In Molecular Biology" (1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN 0-471-50338-X.

As the hybridization method, plaque hybridization or colony hybridization can be used depending upon the library used.

More specifically, when a library to be used is constructed with a phage vector, a suitable host microorganism is mixed with the phage under infectible conditions, which is further mixed with a soft agar medium and plated on an agar medium. A culture is then grown at 37°C until a plaque of an appropriate size appears.

When a library to be used is constructed with a plasmid vector, a suitable host microorganism is transformed with the plasmid to form a transformant. The transformant obtained is suitably diluted and plated on an agar medium. A culture is then grown at

37°C until a colony of an appropriate size appears.

In either case of the above libraries, a membrane filter is placed on the surface of the agar medium after the cultivation, so that the phage or transformant is transferred to the membrane. This membrane is denatured with an alkali, followed by neutralization, and for example, when a nylon membrane is used, the membrane is irradiated with ultraviolet light, so that DNA is fixed on the membrane. This membrane is then subjected to hybridization with the present gene fragment labeled by an ordinary method as a probe. For this method, reference may be made, for example, to D.M. Glover ed., "DNA cloning, a practical approach" IRL PRESS (1985), ISBN 0-947946-18-7. There are various reagents and temperature conditions to be used in the hybridization; for example, prehybridization is carried out by the addition of 6 x SSC (0.9 M NaCl, 0.09 M citric acid), 0.1-1% SDS, 100 µg/ml denatured salmon sperm DNA, and incubation at 65°C for 1 hour. The present gene fragment labeled is then added as a probe, and mixed. Hybridization is carried out at 42-68°C for 4 to 16 hours. The membrane is washed with 2 x SSC, 0.1-1% SDS, further rinsed with 0.2 x SSC, 0-0.1% SDS, and then dried. The membrane is analyzed, for example, by autoradiography or other techniques, to detect the position of the probe on the membrane and thereby select a clone having a nucleotide sequence homologous to that of the probe used. The same procedures are repeated to purify the clone.

In such a manner, a raffinose synthase gene having a nucleotide sequence coding for the amino acid sequence of an enzyme capable of producing raffinose by combining a D-galactosyl group through an  $\alpha(1\rightarrow6)$  bond with a hydroxyl group attached to the carbon atom at position 6 of a D-glucose residue in a sucrose molecule, or a gene fragment thereof, can be detected.

[0013]

Other detection methods can also be used, for example, GENE TRAPPER cDNA Positive Selection System Kit commercially available from Gibco BRL. In this method, a single-stranded DNA library is hybridized with the present gene fragment

biotinylated (i.e., probe), followed by the addition of streptoavidin-bound magnet beads and mixing. From the mixture, the streptoavidin-bound magnetic beads are collected with a magnet, so that single-stranded DNA having a nucleotide sequence homologous to that of the probe used can be collected. The single-stranded DNA obtained can be changed into a double-strand form with a suitable DNA polymerase using a suitable oligonucleotide as a primer.

In such a manner, a raffinose synthase gene having a nucleotide sequence coding for the amino acid sequence of an enzyme capable of producing raffinose by combining a D-galactosyl group through an  $\alpha(1\rightarrow6)$  bond with a hydroxyl group attached to the carbon atom at position 6 of a D-glucose residue in a sucrose molecule, or a gene fragment thereof, can be detected.

[0014]

The present detection method may also be used in the analysis of a plant. More specifically, plant genomic DNA is prepared from a different variety of the specific plant species according to an ordinary method, for example, as described in "Cloning and Sequence (Plant Biotechnology Experiment Manual)" compiled under the supervision of Itaru Watanabe, edited by Masahiro Sugiura, published by Noson Bunka-sha, Tokyo (1989). The plant genomic DNA is digested with at least several kinds of suitable restriction endonucleases, followed by electrophoresis, and a blotted filter is prepared according to an ordinary method. This filter is subjected to hybridization with a probe prepared by the previously described ordinary method, and the difference in the length of a DNA fragment to which the probe hybridizes makes it possible to analyze the difference in phenotypic characteristics accompanied with the expression of raffinose family oligosaccharides between the varieties. Furthermore, when the number of hybridizing bands detected is greater in the specific plant than in the non-gene recombinant plant of the same variety compared by this method, this plant can be found to be a gene recombinant plant. This method may be carried out according to the RFLP (restriction fragment length polymorphism) method, for example, as described in "Plant PCR Experiment Protocols"

compiled under the supervision of Ko Shimamoto and Takuji Sasaki, published by Shujun-sha, Tokyo (1995), ISBN 4-87962-144-7, pp. 90-94.

[0015]

The present gene fragment can be used as a primer in the PCR method to amplify a raffinose synthase gene having a nucleotide sequence coding for the amino acid sequence of an enzyme capable of producing raffinose by combining a D-galactosyl group through an  $\alpha(1\rightarrow6)$  bond with a hydroxyl group attached to the carbon atom at position 6 of a D-glucose residue in a sucrose molecule, or a gene fragment thereof (hereinafter referred to as the present amplification method).

[0016]

More specifically, this may include a PCR method in which the present gene fragments having partial nucleotide sequences of the present gene in the 3'-terminus, at least, preferably having the number of nucleotides ranging from 15 to 50, is synthesized as primers with a plant gene library as a template by an ordinary synthesis method, and a suitable combination of the sense primer at the N-terminus and the antisense primer at the C-terminus of a raffinose synthase is selected from the synthesized primers. The amplified DNA can be confirmed by an ordinary electrophoresis method. In this case, a primer having the same nucleotide sequence as the nucleotide sequence of mRNA synthesized by transcription is referred to as the sense primer, and a primer having a nucleotide sequence complementary to the nucleotide sequence of the mRNA is referred to as the antisense primer. For example, based on the codon table (shown in Figure 1), a mixed primer can also be synthesized so that a residue at a specified position in the primer is changed to a mixture of several bases, depending upon the variation of codons which can encode a certain amino acid. Furthermore, a base capable of forming a pair with plural kinds of bases, such as inosine, can also be used instead of the above mixture of several bases. The plant gene library used herein may include, for example, cDNA libraries or genomic cDNA libraries derived from a desired plant. For the plant gene library, a commercially available library derived from plant can be used as such; or a



library can also be used, which has been prepared according to an ordinary library preparation method, for example, as described in "Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition" (1989), Cold Spring Harbor laboratory Press; or "Current Protocols in Molecular Biology" (1987), John Wiley & Sons, Inc., ISBN 0-471-50338-X. In the present amplification method, cDNA or genomic cDNA prepared from a desired plant can also be used as the plant gene library.

[0017]

The present amplification method can also be used for the analysis of a plant gene. More specifically, for example, plant genomic DNA prepared from different varieties of a specified plant species is used as a template for the PCR method with the present gene fragment as a primer to amplify the present gene region. The PCR product obtained is mixed with a solution of formaldehyde, which is denatured by heating at 85°C for 5 minutes, followed by rapid cooling on ice. This sample is electrophoresed, for example, on a 6% polyacrylamide gel containing 0% or 10% glycerol. For this electrophoresis is used a commercially available electrophoresis apparatus for SSCP (single strand conformation polymorphism), and electrophoresis is carried out, while the gel is kept at a constant temperature, e.g., 5°C, 25°C or 37°C. From the electrophoresed gel, a DNA fragment is detected, for example, by a method such as silver staining method with commercially available reagents.

From the difference in the degree of electrophoresis between the DNA fragments detected, an analysis is carried out for the difference in phenotypic characteristics accompanied with the expression of raffinose family oligosaccharides between the varieties. This method can be carried out according to the SSCP method, for example, as described in "Plant PCR Experiment Protocols" compiled under the supervision of Ko Shimamoto and Takuji Sasaki, published by Shujun-sha, Tokyo (1995), ISBN 4-87962-144-7, pp. 141-146.

[0018]

The present detection method or the present amplification method as described

above can also be used to identify a raffinose synthase gene or a gene fragment thereof, which identified gene or gene fragment thereof is then isolated and purified to obtain the raffinose synthase gene.

[0019]

A chimera gene (hereinafter referred to as the chimera gene) is constructed so as to have a promoter upstream the raffinose synthase gene thus obtained or the above-described present gene. The promoter to be used is not particularly limited, so long as it is functionable in a host organism to be transformed. For example, when the host organism is a plant or a cell thereof, the promoter may include, for example, T-DNA derived constitutive promoters such as nopaline synthase gene (NOS) promoter and octopine synthase gene (OCS) promoter; plant virus-derived promoters such as cauliflower mosaic virus (CaMV) derived 19S and 35S promoter; and derived promoters such as phenylalanine ammonia-lyase (PAL) gene promoter, chalcone synthase (CHS) gene promoter and pathogenesis-related protein (PR) gene promoter. Furthermore, vector pSUM-GY1 (see JP-A 06-189777/1994) can also be used, which has a promoter giving specific expression in a specified plant tissue, e.g., a promoter of soybean-derived seed storage protein glycinin gene. The use of a chimera gene constructed so as to have such a promoter makes it possible to increase or decrease the content of raffinose family oligosaccharides in a specified tissue of a plant.

[0020]

The present chimera gene is then introduced into a host organism according to an ordinary gene engineering method to give a transformant. If necessary, the present chimera gene may be used in the form of a plasmid, depending upon the transformation method for introducing the gene into the host organism. Furthermore, the present chimera gene may contain a terminator. In this case, it is generally preferred that the chimera gene is constructed so as to have a terminator downstream the raffinose synthase gene. The terminator to be used is not particularly limited, so long as it is functionable in a host organism to be transformed. For example, when the host organism is a plant or a cell

thereof, the terminator may include, for example, T-DNA derived constitutive terminators such as nopaline synthase gene (NOS) terminator; and plant derived terminators such as terminators of allium virus GV1 or GV2.

[0021]

For making use of the raffinose synthase gene thus obtained or the above-described present gene, it may be used in the form of a plasmid prepared according to an ordinary gene engineering method. For example, when the host organism is a microorganism, the plasmid constructed is introduced into the microorganism by an ordinary means, for example, as described in "Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition" (1989), Cold Spring Harbor laboratory Press or "Current Protocols in Molecular Biology" (1987), John Wiley & Sons, Inc., ISBN 0-471-50338-X. The microorganism thus transformed is selected with a marker such as antibiotic resistance or auxotrophy. Alternatively, when the host organism is a plant, the plasmid constructed is introduced into a plant cell by an ordinary means such as infection with *Agrobacterium* (see JP-B 2-58917/1990 and JP-A 60-70080/1985), electroporation into protoplasts (see JP-A 60-251887/1985 and JP-B 5-68575/1993) or particle gun method (see JP-A 5-508316/1993 and JP-A 63-258525/1988). The plant cell transformed by the introduction of a plasmid is selected with an antibiotic such as kanamycin or hygromycin. From the plant cell thus transformed, a transformed plant can be regenerated by an ordinary plant cell cultivation method, for example, as described in "Plant Gene Manipulation Manual (How to Produce Transgenic Plants)" written by Uchimiya, 1990, Kodan-sha Scientific (ISBN 4-06-153513-7), pp. 27-55. Furthermore, the collection of seeds from the transformed plant also makes it possible to proliferate the transformed plant. In addition, crossing between the transformed plant obtained and the non-transformed plant makes it possible to produce progenic plants with the character of the transformed plant.

[0022]

As a metabolism modifying method for introducing the raffinose synthase gene obtained or the present gene into a host organism or a cell thereof, and changing the

content of raffinose family oligosaccharides in the host organism or the cell thereof, for example, there can be used a method for metabolic modification to increase the amount of raffinose family oligosaccharides in a host organism or a cell thereof by constructing the present chimera gene comprising the raffinose synthase gene and a promoter linked thereto, in which case the raffinose synthase gene is linked to the promoter in an original direction (positive direction) suitable for transcription, translation and expression as a protein, and then introducing the present chimera gene into the host organism or the cell thereof according to an ordinary gene engineering method; or a method for metabolic modification to decrease the amount of raffinose family oligosaccharides in a host organism or a cell thereof by constructing the present chimera gene comprising the raffinose synthase gene and a promoter linked thereto, in which case the raffinose synthase gene is linked to a promoter in a reverse direction (negative direction) unsuitable for transcription, translation and expression as a protein, and then introducing the present chimera gene into the host organism or the cell thereof according to an ordinary gene engineering method.

[0023]

The term "raffinose synthase protein" as used herein (hereinafter referred to as the present protein) refers to, for example, an enzyme protein having the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 or having an amino acid sequence derived by deletion, replacement, modification or addition of one or several amino acids in the amino acid sequence of SEQ ID NO:1; and capable of producing raffinose by combining a D-galactosyl group through an  $\alpha(1\rightarrow6)$  bond with a hydroxyl group attached to the carbon atom at position 6 of a D-glucose residue in a sucrose molecule.

As a specific example of the present protein is an enzyme protein having the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 (799 amino acids; molecular weight, 89 kDa).

[0024]

The present protein, although it can be prepared, for example, from leguminous plants such as broad bean (*Vicia faba*), by an ordinary biochemical method such as

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> precipitation, ion exchange column, hydrophobic column, hydroxyapatite column or gel filtration column, can also be prepared from the host organism transformed with the present plasmid, or a cell thereof. More specifically, for example, using GST Gene Fusion Vectors Kit of Pharmacia, the present gene is inserted into an expression vector plasmid attached to the kit. The resulting vector plasmid is introduced into a microorganism such as *E. coli* according to an ordinary gene engineering method. A culture of the transformant obtained is grown, for example, on a medium with the addition of IPTG (isopropylthio- $\beta$ -D-galactoside), so that the present protein can be expressed and derived as a fused protein in the culture. The fused protein thus expressed and derived can be isolated and purified by an ordinary method such as disruption of bacterial cells, column operation or SDS-PAGE electrophoresis. The digestion of the fused protein with a protease such as thrombin or blood coagulation factor Xa gives the present protein. This may preferably be made, for example, according to the method described in "Current Protocols In Protein Science" (1995), John Wiley & Sons, Inc. ISBN 0-471-11184-8. The activity of the present protein can be measured, for example, by the method described in L. Lehle and W. Tanner, Eur. J. Biochem., 38, 103-110 (1973).

[0025]

An anti-raffinose synthase antibody capable of binding to a raffinose synthase protein (hereinafter referred to as the present antibody) can be produced by an ordinary immunological method using the present protein prepared above, as an antigen. More specifically, the present antibody can be produced, for example, according to the method described in Ed Harlow and David Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual" (1988), Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0-87969-314-2. The raffinose synthase protein can be detected by treating test proteins with the present antibody thus produced and observing an antigen-antibody reaction between the antibody and the raffinose synthase protein. More specifically, such detection can be carried out according to an immunological technique such as Western blot method or ELISA, for example, as described in Ed Harlow and David Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual" (1988),

Cold Spring Harbor Laboratory Press.

[0026]

The Western blot method is carried out, for example, as follows: Proteins are extracted from a desired plant, for example, according to the method described in *Methods in Enzymology*, volume 182, "Guide to Protein Purification," pp. 174-193, ISBN 9-12-182083-1. The composition of an extraction buffer can suitably be changed depending upon the plant tissue used. The proteins extracted are electrophoresed according to an ordinary SDS-PAGE method. The proteins electrophoresed in the gel are transferred to a membrane by Western blotting with an ordinary electrical method. More specifically, for example, the gel is immersed in a transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol) for 10 minutes, and then placed onto a PVDF membrane cut into the same size as that of the gel. The gel together with the membrane is set in a commercially available transfer apparatus of the semi-dry type. Blotting is carried out at a constant current of 0.8 to 2 mA/cm<sup>2</sup> for 45 minutes to 1 hour. The proteins transferred to the membrane can be detected immunologically with a kit for Western blot detection using a secondary antibody or protein A, which has been labeled with alkaline phosphatase or horseradish peroxidase. At this time, the raffinose synthase protein on the membrane can be detected by the use of the present antibody.

[0027]

In the ELISA method, for example, the property of proteins binding to the surface of a 96-well ELISA plate made of a resin is utilized in principle for the immunological detection of an antigen finally bound to the surface of the ELISA plate. The test proteins are added as a solution and bound to an ELISA plate, followed by blocking, for example, by the addition of PBS containing a protein such as 5% bovine serum albumin. Thereafter, the well is washed with PBS, to which a solution containing the present antibody is added to effect the reaction. After the well is washed, a solution containing a secondary antibody labeled with alkaline phosphatase or horseradish peroxidase is further added to the well, followed by washing. Finally, a substrate solution for detection is

added to the well, and detection is carried out with an ELISA reader.

[0028]

[Examples]

The present invention will be further illustrated by the following examples; however, the present invention is not limited only to these example.

[0029]

#### Example 1 (Purification of Galactinol)

About 250 ml of sugar beet blackstrap molasses was five-fold diluted with methanol. The dilution was centrifuged at 21,400 x g for 15 minutes at room temperature to remove insoluble matter. The supernatant obtained was transferred into a 2-liter Erlenmeyer flask, to which isopropanol at a half volume was added portionwise with stirring. The flask was left at room temperature for a while until the resulting precipitate adhered to the wall of the flask. The supernatant was then discarded by decantation. To the precipitate was added 500 ml of ethanol, and the mixture was washed by stirring with a rotary shaker. The washing was further repeated several times. The washed precipitate was scraped off from the wall of the flask, followed by air drying on a filter paper. The air-dried precipitate (dry powder) was dissolved in purified water to about 40% (w/v). To this solution was added AG501-X8(D) of BioRad, followed by stirring. This operation was repeated until the color of the solution became almost unobserved. The resulting solution was treated with a Sep-Pak QMA column of Millipore, and further pretreated with Sep-Pak CM, Sep-Pak C18 and Sep-Pak Silica columns of Millipore. The resulting solution was loaded at a volume of 5 ml onto a column of Wako-gel LP40C18 (Wako Pure Chemical Industries, 2.6 cm x 85 cm), and eluted with purified water. The sugar content of the eluate was measured with a portable sugar refractometer, and the sugar composition was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) with a Sugar-pak Na (7.8 mm x 300 mm) column of Millipore. The detection of sugars was carried out with model 410 Differential Refractometer of Waters. The eluate containing galactinol was lyophilized, and the resulting lyophilized powder was dissolved in 5 ml of

purified water. The solution was loaded onto a column of TOYOPEARL HW40(S) (Toso, 2.6 cm x 90 cm), and eluted with purified water. The eluate was analyzed in the same manner as described above, so that purified galactinol was obtained.

The galactinol obtained was kept at 25°C for 40 minutes in the reaction mixture that came to contain 80 mM phosphate buffer (pH 6.5), 2 mg/ml galactinol, and 8.3 U  $\alpha$ -galactosidase (Boehringer Mannheim, *E. coli* overproducer 662038). The reaction mixture was extracted with chloroform, and the water layer was analyzed by HPLC. The resulting galactinol was confirmed to be hydrolyzed into galactose and myo-inositol.

[0030]

#### Example 2 (Measurement of Raffinose Synthase Activity)

The raffinose synthase activity was measured under the following conditions according to the description of L. Lehle and W. Tanner, *Eur. J. Biochem.*, 38, 103-110 (1973).

First, 2  $\mu$ l of a protein extract was added to 18  $\mu$ l of the reaction mixture that came to contain 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM DTT (dithiothreitol), 0.01% BSA, 200  $\mu$ M sucrose, 5 mM galactinol, 740 KBq/ml (31.7  $\mu$ M) [ $^{14}$ C] sucrose, and the reaction mixture was kept at 37°C for 3 to 20 hours. After the reaction, 30  $\mu$ l of ethanol was added to the reaction mixture, followed by stirring and centrifugation at 15,000 rpm for 5 minutes. The supernatant was spotted at a volume of 5  $\mu$ l on an HPTLC plate of cellulose for thin layer chromatography (Merck, 10 cm x 20 cm), and developed with n-butanol : pyridine : water : acetic acid = 60 : 40 : 30 : 3. The developed plate was dried and then quantitatively analyzed with an imaging analyzer (Fuji Photographic Film, FUJIX Bio Imaging Analyzer BAS-2000II) for the determination of [ $^{14}$ C] raffinose produced.

[0031]

#### Example 3 (Purification of Raffinose Synthase)

The purification of raffinose synthase from broad bean was carried out as



follows: For each purified protein solution, proteins present in the protein solution were analyzed by SDS-PAGE (Daiichi Kagaku Yakuhin), and the enzyme activity thereof was measured according to the method described in Example 2.

First, 300 g of immature seeds of broad bean (Nintoku Issun) stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  was thawed and then peeled. The peeled seeds were put in 600 ml of 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM DTT (dithiothreitol), 1 mM EDTA, 1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) and 1 mM benzamide, and ground on ice with a mortar. The ground material was centrifuged at  $21,400 \times g$  for 50 minutes at  $4^{\circ}\text{C}$ . To the resulting supernatant was added 10% polyethylene imine (pH 8.0) at a 1/20 volume. The mixture was stirred at  $4^{\circ}\text{C}$  for 15 minutes, and centrifuged at  $15,700 \times g$  for 20 minutes at  $4^{\circ}\text{C}$ . To the resulting supernatant was added 196 g/l of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  with stirring. The mixture was stirred in ice for 30 minutes, and centrifuged at  $15,700 \times g$  for 20 minutes at  $4^{\circ}\text{C}$ . To the resulting supernatant was further added 142 g/l of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  with stirring. After the stirring in ice for 30 minutes, the mixture was centrifuged at  $15,700 \times g$  for 20 minutes at  $4^{\circ}\text{C}$ . The resulting precipitate was dissolved in 50 ml of 100 mM Tris-HCl (pH 7.4) and 5 mM DTT (dithiothreitol), and the solution was dialyzed against 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM DTT (dithiothreitol) and 1 mM EDTA at  $4^{\circ}\text{C}$  overnight. After the dialysis, the suspension was centrifuged at  $70,000 \times g$  for 60 minutes at  $4^{\circ}\text{C}$ . To the resulting supernatant was added 1 mM benzamidine  $\cdot$  HCl, 5 mM  $\epsilon$ -amino-n-caproic acid, 1  $\mu\text{g/ml}$  antipain, 1  $\mu\text{g/ml}$  leupeptin and 10 mM EGTA, and 2 M KCl was further added portionwise at a 1/40 volume. The mixture was loaded onto a column of DEAE-Sephacel (Pharmacia, 2.5 cm x 21.5 cm) equilibrated with 0.05 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM DTT (dithiothreitol) and 1 mM EDTA, and the proteins absorbed on the carrier were eluted with a gradient of 0.05 to 0.5 M KCl. The purification steps up to this stage were repeated three times, and fractions having raffinose synthase activity were combined and then purified as follows:

To the eluted fraction having raffinose synthase activity was added portionwise saturated  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  at a 1/4 volume. The solution was loaded onto a column of

Phenyl-Sepharose (Pharmacia, 2.5 cm x 10.2 cm) equilibrated with 20% saturated  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM DTT (dithiothreitol) and 1 mM EDTA, and the adsorbed proteins were eluted with a gradient of 20% to 0%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . The resulting active fraction was diluted by the addition of 0.01 M potassium phosphate buffer (pH 7.5) at a 2-fold volume. The diluted solution was loaded onto a column of Econo-Pac 10DG (BioRad, 5 ml) previously equilibrated with 0.01 M potassium phosphate buffer (pH 7.5) and 2 mM DTT (dithiothreitol), and the adsorbed proteins were eluted with a gradient of 0.01 to 0.5 M potassium phosphate buffer (pH 7.5) and 2 mM DTT (dithiothreitol). The active fraction obtained at this stage was found to have been purified up to 6500-fold or higher specific activity. Part of the resulting purified protein solution having raffinose synthase activity was loaded onto a column of Superdex 200 (Pharmacia, 1.6 cm x 60 cm) equilibrated with 0.2 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM DTT (dithiothreitol) and 1 mM EDTA. The purified proteins thus separated were subjected to SDS-PAGE, and the raffinose synthase activity was measured. A protein band having raffinose synthase activity was identified as having a molecular weight of about 90 kDa on the SDS-PAGE.

[0032]

#### Example 4 (Analysis of Partial Amino Acid Sequence of Raffinose Synthase)

To about 1 ml of the purified protein solution, which had been purified with a column of Econo-Pac 10DG (BioRad, 5 ml) in Example 3, was added 100% TCA at a 1/9 volume, and the mixture was left on ice for 30 minutes. After centrifugation at 10,000 x g for 15 minutes, the resulting precipitate was suspended in 500  $\mu\text{l}$  of cold acetone ( $-20^\circ\text{C}$ ), followed by further centrifugation. This acetone washing was repeated, and the collected precipitate was dried and then dissolved in 200  $\mu\text{l}$  of SDS-sample buffer, followed by SDS-PAGE. CBB staining was effected for the electrophoresed gel, from which the band of a raffinose synthase protein was cut out.

To the gel thus taken was added 1 ml of 50% acetonitrile and 0.2 M ammonium carbonate (pH 8.9), and washing was continued with stirring at room temperature

for 20 minutes. The gel was washed once again in the same manner, and dried under reduced pressure to an extent giving a volume reduction. To this gel was added 1 ml of 0.02% Tween-20 and 0.2 M ammonium carbonate (pH 8.9), and the mixture was stirred at room temperature for 15 minutes. After removal of the solution, 400  $\mu$ l of 8 M urea and 0.4 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  was added, to which 40  $\mu$ l of 45 mM DTT (dithiothreitol) was further added, and the mixture was left at 50°C for 20 minutes. After complete return to room temperature, 4  $\mu$ l of 1 M iodoacetic acid was added, and the mixture was stirred in the dark at room temperature for 20 minutes. After removal of the solution, 1 ml of purified water was added, and the mixture was stirred at room temperature for 5 minutes, followed by washing. After further two washings, 1 ml of 50% acetonitrile and 0.2 M ammonium carbonate (pH 8.9) was added, and the mixture was stirred at room temperature for 15 minutes. The same treatment was repeated once again, after which the solution was removed, and the gel was dried under reduced pressure to an extent giving a volume reduction.

To this gel was added a solution of Achromobacter Protease I (Takara, Residue-specific Protease Kit) at a volume of 100  $\mu$ l. Further added was 0.02% Tween-20 and 0.2 M ammonium carbonate (pH 8.9) to an extent that the gel was not exposed from the surface of the solution, and the mixture was left at 37°C for 42 hours. Further added was 500  $\mu$ l of 0.09% TFA and 70% acetonitrile, and the mixture was stirred at room temperature for 30 minutes. The resulting mixture as contained in a sample tube was floated in an ultrasonic bath, followed by ultrasonic treatment (BRANSON, 60 W output power) for 5 minutes. The tube and contents thus treated were centrifuged, and the resulting extract was collected in another silicone-coated sample tube. On the other hand, 500  $\mu$ l of 0.09% TFA and 70% acetonitrile was added again to the precipitate, followed by repeated extraction in the same manner as described above. The resulting extracts were combined and then concentrated under reduced pressure to an extent giving a solution remained at a volume of 200 to 300  $\mu$ l. To the concentrate was added 25  $\mu$ l of 8 M urea and 0.4 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , and the mixture was concentrated to an

extent giving a solution remained at a volume of 100  $\mu$ l or lower. The concentrate was brought to about 100  $\mu$ l with purified water, and the mixture was filtered through a filter of Ultrafree C3 GV (Millipore). The filtrate obtained was then subjected to elution through a column of Aquapore BU-300 C-4 (2.1 mm x 300 mm) by a gradient of 0.1% TFA/2.1% to 68.6% acetonitrile. Absorbance at 215 nm was monitored to collect a fraction at a peak thereof. The sample collected was evaporated under reduced pressure to complete dryness, and then analyzed with a Protein Sequencer 473A of ABI to determine a partial amino acid sequence of a raffinose synthase.

[0033]

#### Example 5 (Preparation of cDNA)

About 2 g of immature seeds of broad bean (Nintoku Issun) was frozen in liquid nitrogen and then ground with a mortar, to which 20 ml of Isogen (Nippon Gene) was added, and the mixture was further thoroughly ground. The ground material was transferred into a centrifugation tube, to which 4 ml of chloroform was added, and the mixture was stirred with a vortex mixer and then centrifuged at 6,500 x g for 10 minutes at 4°C. The water layer was collected, to which 10 ml of isopropanol was added, and the mixture was stirred and then centrifuged at 6,500 x g for 10 minutes at 4°C. The resulting precipitate was washed with 10 ml of 70% ethanol and then dissolved in 1 ml of elution buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 0.1% SDS). The solution was left at 60°C for 10 minutes and then centrifuged at 10,000 x g for 1 minute to remove insoluble matter. To the resulting supernatant was added an equivalent volume of Oligotex-dT30 (Takara), and the mixture was stirred and then left at 65°C for 5 minutes. The mixture was placed on ice and then left for 3 minutes, to which 200  $\mu$ l of 5 M NaCl was added, and the mixture was left at 37°C for 10 minutes. The mixture was then centrifuged at 10,000 x g at 4°C for 3 minutes. The precipitate was collected and then suspended in 1 ml of TE buffer, and the suspension was left at 65°C for 5 minutes, which was placed on ice and then left for 3 minutes, followed by centrifugation at 10,000 x g for 3 minutes at 4°C to remove the precipitate.

To the resulting supernatant were added 100 µl of 3 M sodium acetate and 2 ml of ethanol, and RNA was ethanol precipitated and collected. The collected RNA was washed twice with 70% ethanol and then dissolved in 20 µl of sterilized water, which was used for the subsequent cDNA synthesis. The amount of RNA obtained was determined by the measurement of absorbance at 260 nm.

For the cDNA synthesis, First Strand Synthesis Kit for RT-PCR (Amercham) and cDNA Synthesis Kit (Takara) were used, and all operations were made according to the protocol.

[0034]

Example 6 (Nucleotide sequence Analysis of Raffinose Synthase Gene from cDNA)

Based on the amino acid sequence obtained in Example 4, mixed synthetic DNA primers having the nucleotide sequences shown in list 3 below were synthesized. The PCR method was carried out with Gene Amp PCR Systems 2400 and DNA Thermal Cycler Model 480 of Perkin-Elmer using Advantage KlenTaq cDNA Kit of Clontech. The polymerase chain reaction was effected with the above primers. As a result, the combinations of primers 8.2 and 13.3RV, primers 13.4 and 10.3RV, and primers 7.4 and 10.3RV, having the nucleotide sequences shown in list 4 below, gave an amplification of 1.2 kb, 0.5 kb, and 1.2 kb bands, respectively. These amplified DNA fragments were cloned with a TA cloning kit (Invitrogen), followed by sequence reaction using ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit of Perkin-Elmer and nucleotide sequence analysis with a 373S DNA sequencer of ABI. As a result, these DNA fragments were found to have a nucleotide sequence extending from base 813 to base 1915, base 1936 to base 2413, and base 1226 to base 2413, respectively, in the nucleotide sequence of SEQ ID NO:2. Based on these nucleotide sequences, synthetic DNA primers having nucleotide sequences of SEQ ID NO:6 were prepared, and the nucleotide sequences in both terminal regions of cDNA were analyzed with Marathon cDNA Amplification Kit of Clontech. As a result, the nucleotide sequence of SEQ ID

NO:2 was finally determined.

[0035]

(List 3)

#8-2. 26mer

AA (AG) AC (ATGC) GC (ATGC) CC (ATGC) AG (TC) AT (TCA) AT (TCA) GAC AA

#13-4 20mer

AA (AG) AT (TCA) TGG AA (TC) CT (ATGC) AAC AA

#7-4 24mer

AA (AG) GC (ATGC) AG (AG) GT (ATGC) GT (ATGC) GT (ATGC) CC (ATGC) AAG

#13-3RV 21mer

(TC) TT (AG) TT (ATGC) AG (AG) TT CCA (AGT) AT TTT

#10-3RV 21mer

(TC) TT (AG) TC (TC) TC (AG) TA (ATGC) AG (AG) AA TTT

[0036]

(List 4)

RS-2RV 30mer

GGCTGAGGTTTCGGTTCATTCCTGAATCATC

RS-7 30mer

CCAAATGGTACATATTGGCTCCAAGGTTGT

RS-8 30mer

AAGAGTGTATCTGAATTTTCACGCGCGGTG

RS-9 30mer

TGGTGCAATGGGAAAACCTCCAATGAGCACC

RS-10 30mer

ATGAAGTGTCTGATAGATTGAAAGTTTCG

RS-11 30mer

CAGTCTCTGGAGTTTGATGATAATGCAAGT

[0037]

#### Example 7 (Acquisition of Raffinose Synthase Gene from cDNA)

Using the cDNA obtained in Example 5 as a template, and primers designed from the amino acid sequence of SEQ ID NO:1, e.g., primers having nucleotide sequences shown in list 2 above, a DNA fragment of the open reading frame region is

amplified. At this time, the primers are synthesized by the addition of recognition sequences of suitable restriction endonucleases such as *Bam* HI, *Nco* I, *Xho* I, *Pst* I, and *Sac* I, to the respective 5'-termini. The amplified DNA fragment was subcloned in the plasmid pBluescriptII of Stratagene with the recognition sequences of the restriction endonucleases contained in the primers. The nucleotide sequence of the cloned DNA fragment was confirmed with ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit of Perkin-Elmer.

[0038]

[Effects of the Invention]

According to the present invention, it became possible to provide raffinose synthase genes and others.

[0039]

(Brief Description of the Sequences)

1. SEQ ID NO:1:

The sequence of SEQ ID NO:1 shows an amino acid sequence of a raffinose synthase protein encoded in the raffinose synthase gene obtained from broad bean.

2. SEQ ID NO:2:

The sequence of SEQ ID NO:2 shows a cDNA nucleotide sequence of the raffinose synthase gene obtained from broad bean.

3. List 1:

The sequences shown in list 1 are some examples of the nucleotide sequences of primers used in the amplification of a cDNA fragment of a raffinose synthase gene. All of these sequences are based on the nucleotide sequence in the non-coding region of the gene. Depending upon the purpose, recognition sequences for suitable restriction endonucleases can be added to the 5'-termini of these nucleotide sequences in an appropriate manner. Primer 1 is a sense primer corresponding to the 5'-terminus of the cDNA fragment. Primers 2 and 3 are antisense primers corresponding to the 3'-terminus of the cDNA fragment.

4. List 2:

The sequences shown in list 2 are the nucleotide sequences on both terminal regions of an open reading frame coding for the amino acid sequence of a raffinose synthase protein in the cDNA sequence of a raffinose synthase gene. Primers 4 and 5 are sense primers corresponding to the N-terminus of the raffinose synthase protein. Primers 6 and 7 are antisense primers corresponding to the C-terminus of the raffinose synthase protein. Depending upon the purpose, recognition sequences for suitable restriction endonucleases can be added to the 5'-termini of these sequences in an appropriate manner.

5. List 3:

The sequences shown in list 3 are of the primers synthesized on the partial amino acid sequences of the purified broad bean raffinose synthase protein. The bases shown in parentheses mean that a mixture of those bases was used in the synthesis. The symbol "RV" as used after the primer number means that the primer referred to by this symbol has an antisense sequence.

6. List 4:

The nucleotide sequences shown in list 4 are of the primers used in the analysis of both terminal regions of a cDNA nucleotide sequence of the broad bean raffinose synthase gene by the RACE method. The symbol "RV" as used after the primer number means that the primer referred to by this symbol has an antisense sequence.

[0040]

[Sequence Listing]

SEQ ID NO:1:

LENGTH: 800

TYPE: amino acid

TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: peptide

FEATURE

ORIGINAL SOURCE:

ORGANISM: broad bean (*Vicia faba*)

STRAIN: Nintoku Issun



TISSUE TYPE: seeds  
 MOLECULAR TYPE: peptide  
 SEQUENCE DESCRIPTION

|     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|
| 1   | 5   | 10  | 15  |
| Met | Ala | Pro | Pro |
| Ser | Ile | Thr | Lys |
| Thr | Ala | Thr | Leu |
| Gln | Asp | Val | Ile |
| 20  | 25  | 30  |     |
| Ser | Thr | Ile | Asp |
| Ile | Gly | Asn | Gly |
| Asn | Ser | Pro | Leu |
| Phe | Ser | Ile | Thr |
| 35  | 40  | 45  |     |
| Leu | Asp | Gln | Ser |
| Arg | Asp | Phe | Leu |
| Ala | Asn | Gly | His |
| Pro | Phe | Leu | Thr |
| 50  | 55  | 60  |     |
| Gln | Val | Pro | Pro |
| Asn | Ile | Thr | Thr |
| Thr | Thr | Thr | Thr |
| Thr | Thr | Thr | Ala |
| Ser | Ser |     |     |
| 65  | 70  | 75  | 80  |
| Phe | Leu | Asn | Leu |
| Lys | Ser | Asn | Lys |
| Asp | Thr | Ile | Pro |
| Asn | Asn | Asn | Asn |
| 85  | 90  | 95  |     |
| Thr | Met | Leu | Leu |
| Gln | Gln | Gly | Cys |
| Phe | Val | Gly | Phe |
| Asn | Ser | Thr | Glu |
| 100 | 105 | 110 |     |
| Pro | Lys | Ser | His |
| His | Val | Val | Pro |
| Leu | Gly | Lys | Leu |
| Lys | Gly | Ile | Lys |
| 115 | 120 | 125 |     |
| Phe | Met | Ser | Ile |
| Phe | Arg | Phe | Lys |
| Val | Trp | Trp | Thr |
| Thr | Thr | His | Trp |
| Val |     |     |     |
| 130 | 135 | 140 |     |
| Gly | Thr | Asn | Gly |
| Gln | Glu | Leu | Gln |
| His | Glu | Thr | Gln |
| Met | Leu | Ile | Leu |
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| Asp | Lys | Asn | Asp |
| Ser | Leu | Gly | Arg |
| Pro | Tyr | Val | Leu |
| Leu | Leu | Leu | Pro |
| Ile |     |     |     |
| 165 | 170 | 175 |     |
| Leu | Glu | Asn | Thr |
| Phe | Arg | Thr | Ser |
| Leu | Gln | Pro | Gly |
| Leu | Asn | Asp | His |
| 180 | 185 | 190 |     |
| Ile | Gly | Met | Ser |
| Val | Glu | Ser | Gly |
| Ser | Thr | His | Val |
| Thr | Gly | Ser | Ser |

|   |     |     |
|---|-----|-----|
| 195   | 200 | 205 |
| Phe Lys Ala Cys Leu Tyr Ile His Leu Ser Asn Asp Pro Tyr Ser Ile |     |     |
| 210   | 215 | 220 |
| Leu Lys Glu Ala Val Lys Val Ile Gln Thr Gln Leu Gly Thr Phe Lys |     |     |
| 225   | 230 | 235 |
| Thr Leu Glu Glu Lys Thr Ala Pro Ser Ile Ile Asp Lys Phe Gly Trp |     |     |
| 245   | 250 | 255 |
| Cys Thr Trp Asp Ala Phe Tyr Leu Lys Val His Pro Lys Gly Val Trp |     |     |
| 260   | 265 | 270 |
| Glu Gly Val Lys Ser Leu Thr Asp Gly Gly Cys Pro Pro Gly Phe Val |     |     |
| 275   | 280 | 285 |
| Ile Ile Asp Asp Gly Trp Gln Ser Ile Cys His Asp Asp Asp Asp Glu |     |     |
| 290   | 295 | 300 |
| Asp Asp Ser Gly Met Asn Arg Thr Ser Ala Gly Glu Gln Met Pro Cys |     |     |
| 305   | 310 | 315 |
| Arg Leu Val Lys Tyr Glu Glu Asn Ser Lys Phe Arg Glu Tyr Glu Asn |     |     |
| 320   | 325 | 330 |
| Pro Glu Asn Gly Gly Lys Lys Gly Leu Gly Gly Phe Val Arg Asp Leu |     |     |
| 340   | 345 | 350 |
| Lys Glu Glu Phe Gly Ser Val Glu Ser Val Tyr Val Trp His Ala Leu |     |     |
| 355   | 360 | 365 |
| Cys Gly Tyr Trp Gly Gly Val Arg Pro Gly Val His Gly Met Pro Lys |     |     |
| 370   | 375 | 380 |
| Ala Arg Val Val Val Pro Lys Val Ser Gln Gly Leu Lys Met Thr Met |     |     |
| 385   | 390 | 395 |
| Glu Asp Leu Ala Val Asp Lys Ile Val Glu Asn Gly Val Gly Leu Val |     |     |
| 405   | 410 | 415 |
| Pro Pro Asp Phe Ala His Glu Met Phe Asp Gly Leu His Ser His Leu |     |     |
| 420   | 425 | 430 |

|   |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|
| Glu Ser Ala Gly Ile Asp Gly Val Lys Val Asp Val Ile His Leu Leu |     |     |     |
| 435   | 440 | 445 |     |
| Glu Leu Leu Ser Glu Glu Tyr Gly Gly Arg Val Glu Leu Ala Arg Ala |     |     |     |
| 450   | 455 | 460 |     |
| Tyr Tyr Lys Ala Leu Thr Ser Ser Val Lys Lys His Phe Lys Gly Asn |     |     |     |
| 465   | 470 | 475 | 480 |
| Gly Val Ile Ala Ser Met Glu His Cys Asn Asp Phe Phe Leu Leu Gly |     |     |     |
| 485   | 490 | 495 |     |
| Thr Glu Ala Ile Ser Leu Gly Arg Val Gly Asp Asp Phe Trp Cys Ser |     |     |     |
| 500   | 505 | 510 |     |
| Asp Pro Ser Gly Asp Pro Asn Gly Thr Tyr Trp Leu Gln Gly Cys His |     |     |     |
| 515   | 520 | 525 |     |
| Met Val His Cys Ala Tyr Asn Ser Leu Trp Met Gly Asn Phe Ile Gln |     |     |     |
| 530   | 535 | 540 |     |
| Pro Asp Trp Asp Met Phe Gln Ser Thr His Pro Cys Ala Glu Phe His |     |     |     |
| 545   | 550 | 555 | 560 |
| Ala Ala Ser Arg Ala Ile Ser Gly Gly Pro Ile Tyr Val Ser Asp Cys |     |     |     |
| 565   | 570 | 575 |     |
| Val Gly Asn His Asn Phe Lys Leu Leu Lys Ser Leu Val Leu Pro Asp |     |     |     |
| 580   | 585 | 590 |     |
| Gly Ser Ile Leu Arg Cys Gln His Tyr Ala Leu Pro Thr Arg Asp Cys |     |     |     |
| 595   | 600 | 605 |     |
| Leu Phe Glu Asp Pro Leu His Asn Gly Lys Thr Met Leu Lys Ile Trp |     |     |     |
| 610   | 615 | 620 |     |
| Asn Leu Asn Lys Tyr Thr Gly Val Leu Gly Leu Phe Asn Cys Gln Gly |     |     |     |
| 625   | 630 | 635 | 640 |
| Gly Gly Trp Cys Pro Glu Ala Arg Arg Asn Lys Ser Val Ser Glu Phe |     |     |     |
| 645   | 650 | 655 |     |
| Ser Arg Ala Val Thr Cys Tyr Ala Ser Pro Glu Asp Ile Glu Trp Cys |     |     |     |

|   |     |     |
|---|-----|-----|
| 660   | 665 | 670 |
| Asn Gly Lys Thr Pro Met Ser Thr Lys Gly Val Asp Phe Phe Ala Val |     |     |
| 675   | 680 | 685 |
| Tyr Phe Phe Lys Glu Lys Lys Leu Arg Leu Met Lys Cys Ser Asp Arg |     |     |
| 690   | 695 | 700 |
| Leu Lys Val Ser Leu Glu Pro Phe Ser Phe Glu Leu Met Thr Val Ser |     |     |
| 705   | 710 | 715 |
| Pro Val Lys Val Phe Ser Lys Arg Phe Ile Gln Phe Ala Pro Ile Gly |     |     |
| 725   | 730 | 735 |
| Leu Val Asn Met Leu Asn Ser Gly Gly Ala Ile Gln Ser Leu Glu Phe |     |     |
| 740   | 745 | 750 |
| Asp Asp Asn Ala Ser Leu Val Lys Ile Gly Val Arg Gly Cys Gly Glu |     |     |
| 755   | 760 | 765 |
| Met Ser Val Phe Ala Ser Glu Lys Pro Val Cys Cys Lys Ile Asp Gly |     |     |
| 770   | 775 | 780 |
| Val Lys Val Lys Phe Leu Tyr Glu Asp Lys Met Ala Arg Val Gln Ile |     |     |
| 785   | 790 | 795 |
| Leu Trp Pro Ser Ser Ser Thr Leu Ser Leu Val Gln Phe Leu Phe *** |     |     |

[0041]

SEQ ID NO:2:

LENGTH: 2746

TYPE: nucleic acid

STRANDEDNESS: single

TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: cDNA to mRNA

FEATURE

NAME/KEY: peptide

LOCATION: 101 .. 2500

IDENTIFICATION METHOD: E

# SEQUENCE DESCRIPTION

AATTTTCAAG CATAGCCAAG TTAACCACCT TAGAAACATT CCTACAAGCT ACTTATCCCT 60  
GTCAATAAGC TACTAAGCTA CCAGAGTCTC ATCAATCACC 100  
ATG GCA CCA CCA AGC ATA ACC AAA ACT GCA ACC CTC CAA GAC GTA ATA 148  
AGC ACC ATC GAT ATT GGT AAT GGT AAC TCA CCC TTA TTC TCC ATA ACC 196  
TTA GAC CAA TCA CGT GAC TTC CTT GCA AAT GGC CAC CCT TTC CTC ACC 244  
CAA GTC CCA CCT AAC ATA ACA ACA ACA ACA ACC ACT GCT TCC TCT 292  
TTT CTC AAT CTC AAA TCC AAC AAA GAT ACC ATT CCC AAC AAC AAC AAC 340  
ACC ATG TTG TTG CAA CAA GGT TGT TTC GTT GGT TTC AAC TCC ACC GAA 388  
CCC AAA AGC CAC CAC GTA GTT CCA CTC GGC AAA CTA AAA GGA ATC AAA 436  
TTC ATG AGC ATA TTC CGG TTC AAA GTT TGG TGG ACA ACT CAC TGG GTC 484  
GGA ACA AAT GGA CAG GAA CTA CAA CAC GAA ACA CAA ATG TTA ATC CTG 532  
GAC AAA AAC GAC TCC CTC GGA CGA CCC TAT GTC TTA CTC CTC CCA ATC 580  
CTA GAA AAC ACC TTC CGA ACC TCA CTC CAA CCC GGT CTC AAC GAT CAC 628  
ATA GGC ATG TCC GTC GAA AGC GGT TCA ACA CAT GTC ACC GGG TCA AGC 676  
TTC AAA GCA TGT CTT TAC ATC CAT CTC AGT AAC GAC CCA TAC AGT ATA 724  
CTA AAA GAA GCA GTT AAA GTA ATC CAA ACT CAG TTA GGA ACA TTC AAG 772  
ACT CTT GAA GAA AAA ACA GCA CCT AGT ATT ATA GAC AAA TTC GGT TGG 820  
TGC ACG TGG GAT GCT TTT TAC TTG AAG GTT CAT CCA AAA GGT GTA TGG 868  
GAA GGT GTA AAG TCT CTC ACA GAT GGT GGT TGT CCT CCC GGT TTC GTC 916  
ATA ATC GAC GAC GGT TGG CAA TCC ATT TGT CAT GAC GAT GAC GAT GAA 964  
GAT GAT TCA GGA ATG AAC CGA ACC TCA GCC GGG GAA CAA ATG CCA TGC 1012  
AGA CTT GTA AAA TAC GAA GAG AAT TCT AAG TTT AGA GAA TAT GAG AAT 1060  
CCT GAA AAT GGA GGG AAG AAA GGT TTG GGT GGT TTT GTG AGG GAT TTG 1108  
AAG GAA GAG TTT GGG AGT GTG GAG AGT GTT TAT GTT TGG CAT GCG CTT 1156  
TGT GGG TAT TGG GGC GGG GTT AGG CCT GGA GTG CAT GGG ATG CCG AAA 1204  
GCT AGG GTT GTT GTT CCG AAG GTG TCT CAG GGG TTG AAG ATG ACG ATG 1252  
GAG GAT TTG GCG GTG GAT AAG ATT GTT GAG AAC GGT GTG GGG CTA GTG 1300  
CCG CCA GAT TTT GCA CAT GAG ATG TTT GAT GGG CTT CAC TCT CAT TTG 1348

GAG TCG GCG GGA ATT GAC GGT GTT AAA GTT GAT GTT ATC CAT CTG CTT 1396  
GAG TTA CTA TCA GAG GAA TAT GGT GGA CGA GTT GAG CTA GCA AGA GCT 1444  
TAT TAC AAA GCA CTA ACC TCA TCA GTG AAG AAA CAT TTC AAA GGC AAT 1492  
GGT GTA ATT GCT AGC ATG GAG CAT TGC AAC GAC TTC TTT CTC CTC GGC 1540  
ACC GAA GCC ATA TCC CTC GGC CGC GTC GGA GAT GAT TTT TGG TGC TCT 1588  
GAT CCA TCT GGT GAT CCA AAT GGT ACA TAT TGG CTC CAA GGT TGT CAC 1636  
ATG GTA CAT TGT GCC TAC AAC AGT TTA TGG ATG GGA AAT TTC ATT CAG 1684  
CCA GAT TGG GAC ATG TTT CAG TCC ACT CAT CCT TGT GCT GAA TTT CAT 1732  
GCC GCC TCA CGA GCC ATA TCC GGC GGA CCA ATT TAT GTT AGT GAT TGT 1780  
GTT GGT AAT CAC AAT TTC AAG TTG CTC AAA TCT CTT GTT TTG CCC GAT 1828  
GGT TCT ATC TTG CGT TGT CAA CAT TAC GCA CTC CCT ACA AGA GAT TGC 1876  
TTG TTT GAA GAC CCT TTG CAT AAT GGC AAA ACA ATG CTG AAA ATT TGG 1924  
AAT CTC AAC AAA TAT ACA GGT GTT TTG GGT CTT TTC AAC TGC CAA GGT 1972  
GGT GGG TGG TGT CCT GAG GCA CGG CGA AAC AAG AGT GTA TCT GAA TTT 2020  
TCA CGC GCG GTG ACA TGT TAT GCA AGT CCC GAA GAC ATT GAA TGG TGC 2068  
AAT GGG AAA ACT CCA ATG AGC ACC AAA GGT GTG GAT TTT TTT GCT GTG 2116  
TAT TTT TTC AAG GAG AAG AAA TTG AGG CTC ATG AAG TGT TCT GAT AGA 2164  
TTG AAA GTT TCG CTT GAG CCA TTT AGT TTT GAG CTA ATG ACA GTG TCT 2212  
CCA GTG AAA GTG TTT TCG AAA AGG TTT ATA CAG TTT GCA CCG ATT GGG 2260  
TTA GTG AAC ATG CTG AAC TCT GGT GGT GCG ATT CAG TCT CTG GAG TTT 2308  
GAT GAT AAT GCA AGT TTG GTC AAG ATT GGG GTG AGA GGT TGC GGG GAG 2356  
ATG AGC GTG TTT GCG TCT GAG AAA CCG GTT TGC TGC AAA ATT GAT GGG 2404  
GTT AAG GTG AAA TTT CTT TAT GAG GAC AAA ATG GCA AGA GTT CAA ATT 2452  
CTG TGG CCT AGT TCT TCA ACA TTG TCT TTG GTC CAG TTT TTA TTT TGA 2500  
TCCCTAGGAA TCCTATGCAC GTGTCTCTGT TTACAAGTAC TTTATATAAG TATAATATGT 2560  
ATCTATTTCC ATTTTAACT GTCTTTATGC AATTAGGTGG TCAATTAGTTA TTTGTTTGT 2620  
GAAGTAACTA ACTTGCTTGT GTTGTAAGCT TATAATATAT GGTCAAGTTCC TCACTTGTA 2680  
TATACCTGTT GTATGTATAA ATTTTACTAT ATATGACTAA CATCATTATCT TGTGAGCAA 2740  
AAAAAA 2746

[Brief Description of Drawing]

[Figure 1]

Figure 1 is a codon table showing the correspondence of amino acids encoded in nucleotide sequences. Codons are shown so that their 5'-termini come to the left side, and they exhibit the nucleotide sequences in the mRNA. "U" represents uracil in the RNA, which corresponds to thymine in the DNA.

[Document Name] Drawing

[Figure 1]

|     |     |     |     |      |     |      |     |
|-----|-----|-----|-----|------|-----|------|-----|
| Phe | UUU | Ser | UCU | Tyr  | UAU | Cys  | UGU |
|     | UUC |     | UCC |      | UAC |      | UGC |
| Leu | UUA | Pro | UCA | Stop | UAA | Stop | UGA |
|     | UUG |     | UCG |      | UAG |      | UGG |
|     | CUU |     | CCU | His  | CAU | Arg  | CGU |
|     | CUC |     | CCC |      | CAC |      | CGC |
| Ile | CUA | Thr | CCA | Gln  | CAA |      | CGA |
|     | CUG |     | CCG |      | CAG |      | CGG |
|     | AUU |     | ACU | Asn  | AAU | Ser  | AGU |
|     | AUC |     | ACC |      | AAC |      | AGC |
| Met | AUA |     | ACA | Lys  | AAA | Arg  | AGA |
|     | AUG |     | ACG |      | AAG |      | AGG |
| Val | GUU | Ala | GCU | Asp  | GAU | Gly  | GGU |
|     | GUC |     | GCC |      | GAC |      | GGC |
|     | GUA |     | GCA | Glu  | GAA |      | GGA |
|     | GUG |     | GCG |      | GAG |      | GGG |



[Document Name] Abstract

[Abstract]

[Problems]

To provide raffinose synthase genes and others.

[Solving Means]

Raffinose synthase genes characterized in that they are about 2.7 kbp genes isolated from a plant and they have nucleotide sequences coding for the amino acid sequences of enzymes capable of producing raffinose by combining a D-galactosyl group through an  $\alpha(1\rightarrow6)$  bond with a hydroxyl group attached to the carbon atom at position 6 of a D-glucose residue in a sucrose molecule; and others.

[Representative Drawing] None

Document Name: Official Correction Data

Corrected Document: Application for Patent

Approved or Supplemented Data:

Applicant(s):

Identification No.: 000002093  
Address: 5-33, Kitahama 4-chome, Chuo-ku,  
Osaka-shi, Osaka-fu  
Name: Sumitomo Chemical Company, Limited

Patent Attorney(ies):

Identification No.: 100093285  
Address: c/o Sumitomo Chemical Company,  
Limited, 5-33, Kitahama 4-chome,  
Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka-fu  
Name: Takashi KUBOYAMA

Identification No.: 100094477  
Address: c/o Sumitomo Chemical Company,  
Limited, 5-33, Kitahama 4-chome,  
Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka-fu  
Name: Naoyoshi JINNO

Applicant Record

Identification No.: 000002093

1. Date of Registration: August 28, 1990 (newly recorded)

Address: 5-33, Kitahama 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi,  
Osaka-fu

Name: Sumitomo Chemical Company, Limited